
Bachelorarbeit

Frau
Denise Stephanie Jahn

**Einfluss der Trauma-Zytokine
IL-6, TNF α & EPO auf das
Transkriptom mesenchymaler
Stammzellen**

Mittweida, 2022

Angewandte Computer- und
Biowissenschaften

Bachelorarbeit

Einfluss der Trauma-Zytokine IL-6, TNF α & EPO auf das Transkriptom mesenchymaler Stammzellen

Autor:
Frau

Denise Stephanie Jahn

Studiengang:
Biotechnologie

Seminargruppe:
BT19wM-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:
Prof. Dr. med. Augustinus Bader

weitere Betreuer:
Dipl. Ing. (FH) Sandra Feik

Einreichung:
Mittweida, 05.09.2022

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2022

Bibliographische Beschreibung:

Jahn, Denise: Einfluss der Trauma-Zytokine IL-6, TNF α & EPO auf das Transkriptom mesenchymaler Stammzellen. - 2022. – 8, 50, 8 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelor, 2022

Englischer Titel

Effect of trauma cytokines IL-6, TNF α & EPO on the transcriptome of mesenchymal stem cells

Kurzbeschreibung:

Mit den Trauma-Zytokinen IL-6, TNF α & EPO wurde der Einfluss auf das Transkriptom mesenchymaler Hautstammzellen untersucht. Dabei wurde sich vor allem auf die Expression krebsassoziierte Gene konzentriert und untersucht, ob EPO möglicherweise eine Verringerung der Expression solcher Gene hervorruft. Dazu hat man das Transkriptom von Zellen sequenziert, die unter Einfluss der Zytokinen in verschiedenen Zusammensetzung standen. Mithilfe einer differentiellen Expressionsanalyse (DE) konnte eine erhöhte Menge an RNA sowie erhöhte Expression von krebsassoziierten in den Zellen unter Einfluss der Zytokine festgestellt werden. Zellen, denen neben TNF α , IL-6 das Zytokin EPO hinzugegeben wurden, zeigten keine Verringerung krebsassoziiertes Gene auf. Außerdem konnte eine Reaktion der Zellen auf eine durch TNF α und IL-6 simulierte Immunreaktion festgestellt werden. Auch Gene, die für Hautzellen eher untypisch sind, und somit noch einen unspezifischen Differenzierungsgrad der Stammzellen aufzeigen, konnten identifiziert werden.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei dem gesamten Team der Professur für „Zelltechniken und angewandte Stammzellbiologie“ der Universität Leipzig für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der gesamten Arbeitszeit.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Augustinus Bader und Fahdi Mohsen Zaher, dass sie mir ermöglicht haben, mich mit diesen Thema zu beschäftigen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Anne Kirsten, die mich in die Zellkulturtechnik eingelernt hat und bei Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich mich bei dem Team der DNA Core Unit der Universität Leipzig bedanken, die die RNA-Sequenzierung durchgeführt haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis.....III

TabellenverzeichnisIV

Abkürzungsverzeichnis V

1 Einleitung..... 1

 1.1 Mesenchymale Stammzellen 2

 1.1.1 Mesenchymale stammzellähnliche Fibroblasten (FmSCS) 3

 1.2 Aufbau der Haut..... 5

 1.3 Zytokine 6

 1.3.1 Erythropoetin (EPO) 7

 1.3.2 Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α 9

 1.3.3 Interleukin 6 (IL-6) 11

2 Zielstellung 13

3 Material..... 14

 3.1 Chemikalien 14

 3.2 Medien 14

 3.3 Molekularbiologische Reagenzien..... 14

 3.4 Material 15

 3.5 Geräte 16

4 Methoden 17

 4.1 Reaktivierung der FmSCs UKL001 17

 4.2 Passagieren der Zellkulturen..... 17

 4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl..... 18

 4.4 Vorbereitung der FACS-Analyse..... 18

 4.5 FACS-Analyse 19

 4.6 Kultivieren der FmSCs UKL001 mit den Zytokinen EPO, TNF α und IL-6 19

 4.7 RNA-Isolation..... 20

 4.7.1 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit der Proben 21

 4.8 Analyse des Transkriptoms mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)..... 21

 4.9 Differentielle Expressionsanalyse..... 21

5 Ergebnisse..... 23

5.1 Charakterisierung der FmSCs UKL001 mittels Durchflusszytometrie	23
5.2 Analyse des Transkriptom der FmSCs UKL001 unter Einfluss der Zytokine TNF α , IL-6 und EPO	24
5.2.1 Bestimmung der RNA-Konzentration	24
5.2.2 Bestimmung der Probenreinheit	25
5.2.3 Quantifizierte Ergebnisse der differentiellen Expressionsanalyse.....	26
5.2.4 Qualitative Ergebnisse der differentiellen Expressionsanalyse	30
6 Diskussion	33
6.1 FACS-Analyse	33
6.2 Einfluss der Trauma-Zytokine TNF α , IL-6 und EPO auf das Transkriptom mesenchymaler Stammzellen.....	34
6.2.1 RNA-Konzentration und Probenreinheit	34
6.2.2 Differentielle Expressionsanalyse.....	35
7 Ausblick	40
8 Zusammenfassung	41
9 Summary.....	44
Literaturverzeichnis	46
Anhang.....	51
Anhang A – RNeasy [®] Plus Mini Kit von Qiagen	51
Anhang B – Ergebnisse Spektralphotometrie Nano-Drop.....	54
Anhang C – Ergebnisse der Durchflusszytometrie	54
Anhang D – Ergebnisse differentieller Expressionsanalyse	57
Selbstständigkeitserklärung.....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungspotenzial mesenchymaler Stammzellen [Kühl, S. & Kühl, M. 2012]	3
Abbildung 2: Aufnahme dermalen FmSCs mittels Phasenkontrastmikroskop [100-fache Vergrößerung].....	4
Abbildung 3: Schichten der Haut im Querschnitt [URL-9].....	6
Abbildung 4: Struktur des Erythropoetin [Cheetham, J. C. et al. 1998].....	8
Abbildung 5: Bindung von EPO an EpoR [Bunn, H. F. 2013].....	9
Abbildung 6: Struktur des Proteins TNF α (PDB: 6RMJ) [Degano, M. & Garau, G. 2019]	10
Abbildung 7: Struktur des humanen Interleukin-6 (PDB: 1ALU) [Somers, W. S. et al. 1998]	12
Abbildung 8: Dot-Plot der FACS-Analyse (A) und prozentuale Verteilung (B) der FmSCs	23
Abbildung 9: Menge der exprimierten RNA in den Ansätzen KA, TNF α , IL-6 und EPO	24
Abbildung 10: Adsorptionsverhältnisse A260/A280 (A) und A260/A230 (B) der Ansätze KA, TNF α , IL-6 und EPO	25
Abbildung 11: Signifikant mehr oder weniger exprimierte Gene	27
Abbildung 12: Anzahl an krebsassoziierten und nicht krebsassoziierten Genen.....	28
Abbildung 13: Signifikant mehr oder weniger exprimierte, krebsassoziierte Gene.....	29
Abbildung 14: VENN-Diagramm zum Vergleich der signifikant erhöhten Expression krebsassoziierten Gene zwischen den Ansätzen TNF α , IL-6 und EPO gegenüber KA	30
Abbildung 15: Signifikant am meist exprimierten Genen der Ansätze TNF α , IL-6 und EPO gegenüber KA	31
Abbildung 16: Dotplot zur Kalibrierung des FACS-Gerätes	54
Abbildung 17: Dotplot und Quantifizierung unmarkierter Zellen.....	55
Abbildung 18: Dotplot und Quantifizierung CD271 ⁺ -markierter Zellen.....	55
Abbildung 19: Dotplot und Quantifizierung CD90 ⁺ -markierter Zellen	55
Abbildung 20: Dotplot und Quantifizierung der verwendeten FmSCs.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der FmSC-Kulturen mit und ohne Zytokine..... 15
Tabelle 2: Zusammensetzung der Ansätze zur Vorbereitung der FACS-Analyse 15
Tabelle 3: Ergebnisse der Spektralphotometrie der FmSCs 54
Tabelle 4: Koeffizienten der contrast-Matrix und die dazugehörigen Gene 57

Abkürzungsverzeichnis

27-HC	27-Hydroxycholesterin
A2M	Alpha-2-Macroglobulin
ACAN	Aggrecan
ADH1B	Alkoholdehydrogenase-1B
AQP1	Aquaporin-1
ASPN	Asporin
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
C3	Complement 3
CD	Cluster of Differentiation
C/EBPs	CCAAT/Enhancer-Binding-Proteins
CMPK2	Cytidine/uridine monophosphate kinase 2
COL14 α 1	Collagen-Typ XIV α 1
COL15 α 1	Collagen-Typ XV α 1
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CRLF1	Cytokine receptor-like factor 1
CSF	colony stimulating factor
CSGALNACT1	Chondroitinsulfat-N-Acetylgalactosaminyltransferase
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1
CXCL5	C-X-C motif chemokine ligand 5

CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10
CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11
CYP7B1	Cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1
DAVID	Database for annotation, visualization and integrated discovery
DE	Differentielle Expressionsanalyse
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
EpoR	Erythropoetin-Rezeptor
FACS	Flourescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal calf serum
FmSCs	Fibroblastic mesenchymal stem-cell-like cells (dt.: mesenchymale stammzellähnliche Fibroblasten)
Gp130	Glykoprotein 130
HES1	Transkriptionsfaktor 1
hFmSCs	Human fibroblastic mesenchymal stem-cell-like cells
HLA-DR	Human leukocyte antigen – DR
HLA-ABC	Human leukocyte antigen – ABC
hMSCs	Human mesenchymal stem cells

IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-4I1	Interleukin 4 induced 1
IL-6	Interleukin 6
IL-6-R	Interleukin-6-Rezeptor
INMT	Indoethylamine N-Methyltransferase
KA	Kontrollansatz
logCPM	Log count per million
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
MEOX1	mesenchyme homebox 1
MyoD	Myogener Faktor 3
NGFR	Nerve growth factor receptor
PBS	Phosphate buffered saline (dt. : Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PI16	Peptidase-Inhibitor-16
PODN	Podocan
PPAA γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PPL	Periplakin
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SERPINB2	Serpin family B member 2

sIL-6-R	soluble Interleukin-6-Receptor
SOX9	Transkriptionsfaktor SOX9
SSEA	Stage-specific embryonic antigen
STEAP4	STEAP4 Metallreduktase
SVEP1	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1
TMM	Trimmed mean of M values (dt.: getrimmter Mittelwert der M-Werte)
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α induced protein 3
TNF-R1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1
TNF-R2	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2
TNFSFL	tumor necrosis factor superfamily-Liganden
USP18	Ubiquitin specific peptidase 18
w/o	Without
ZK	Zellkultur
ZKF	Zellkulturflasche
ZNF512B	Zinc finger protein 512B

1 Einleitung

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie, welches auf Francis Crick zurückgeht, beschreibt „den gerichteten Informationsfluss der genetischen Information vom Träger der Erbinformation DNA über RNA als Vermittler hin zum Protein“ [URL-8]. Dieser Vorgang wird durch die beiden Schrittfolgen der Transkription und Translation ermöglicht, wobei es bei der Transkription zur Übertragung der genetischen Erbinformation, die in der DNA langlebig verankert ist, auf die kurzlebige RNA übertragen wird. Die Translation hingegen ist die Übersetzung der mRNAs in Proteine. Je nach Zelltyp variieren dabei die Proteine in ihrer Menge, Art und Funktion. Denn es werden nicht alle Gene der DNA gleichzeitig exprimiert. Je nach Art oder Differenzierungszustand der Zelle oder bestimmten äußeren Einflüssen werden zu einem bestimmten Zeitpunkt unterschiedliche Gene in der Zelle exprimiert. Die dabei transkribierte gesamte RNA wird schlussendlich als „Transkriptom“ beschrieben. Mithilfe einer Transkriptomanalyse lässt rückwirkend diese Gesamtheit der RNA, unter Beachtung der Umstände in der sich die Zelle befindet, bestimmen und Rückschlüsse auf das mögliche Bestehen einer Krankheit, die Effizienz eines für die Diagnose einer Krankheit benötigten Biomarkers oder Herkunftsort der Zelle selbst ziehen. Auch die Wirkung eines potenziellen Medikamentes auf die Zelle kann dadurch untersucht werden [Blumenberg, M. 2019].

So wird das Zytokin Erythropoetin (EPO) inzwischen als Medikament für viele verschiedene Krankheiten, wie Malaria [Bienvenu, A.-L. et al. 2008], Blutarmut [Jelkmann, W. & Metzner, E. 1996] oder auch Krebs eingesetzt. In Verbindung mit anderen Trauma-Zytokinen wie IL-6 und IL-1 β und TNF α zeigt EPO außerdem eine verbesserte Regeneration der Haut durch Förderung des Zellwachstum der sogenannten mesenchymalen Fibroblasten (FmSCs) [Bader, a. et al. 2011].

Allerdings gehören TNF α und IL-6 zu den proinflammatorischen Zytokinen, die Entzündungen fördern, die wiederum einerseits für eine erfolgreiche Immunantwort mitentscheidend, andererseits auch eine Tumorbildung in allen Stadien antreibt [Greten, F. R. & Grivennikov, S. I. 2019]. Damit stellt sich die Frage, welchen Einfluss TNF α und IL-6 auf das Transkriptom von Zellen, z.B. mesenchymale Fibroblasten, haben und wie sich das Transkriptom in Verbindung mit EPO ändert.

1.1 Mesenchymale Stammzellen

Zu einer Untergruppe der adulten Stammzellen zählen mesenchymale Stammzellen (MSCs). Erstmals wurden Fibroblasten-ähnlich aussehende Zellen 1968 aus dem Knochenmark des Menschen isoliert und als MSCs beschrieben, die fähig waren in Knochenmarkszellen (Osteozyten) zu differenzieren [Wagner, W. et al. 2005; Kühl, S. & Kühl, M. 2012]. Weitere Isolationen von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) können aus Gewebe erfolgen, die sich aus dem Mesenchym (embryonales Bindegewebe) entwickelt haben. Dazu gehören unter anderem die Haut, die Leber, [Rosanski, M. 08. Februar 2012], Fettgewebe, Muskelgewebe, aber auch peripheres Blut. Nicht-invasiv hingegen können sie Haarfollikeln, die Plazenta, Nabelschnurblut und Nabelschnurgewebe entnommen werden [Sack, U. 2016]. Im Knochenmark jedoch treten mesenchymale Stammzellen am häufigsten auf [Kühl, S. & Kühl, M. 2012], wodurch dies meist als Stammzellquelle dient, aber einen invasiven Eingriff erfordert und die gewonnene Zellmenge stark limitiert ist [Tam, K. et al. 2014]. Auch nimmt ihr Proliferations- und Differenzierungspotenzial mit dem Alter stetig ab. Als weitere Quelle dient daher auch oft extraembryonales Gewebe, wie die Plazenta und die Nabelschnur. Diese Art von Gewebe ist häufig in großer Menge vorhanden und eine Extraktion ist ebenfalls möglich. Außerdem haben sie im Gegensatz zu Knochenmarksstammzellen eher eine multipotente Eigenschaft [Fuchs, J. M. 14. Februar 2016].

MSCs dienen beim Menschen hauptsächlich zur Erhaltung und Regeneration mesenchymalen Gewebes, zu denen beispielsweise Knochen, Muskeln, das Herz und die Niere gehören [Sack, U. 2016]. Ihnen ist hierbei die Fähigkeit der Multipotenz zuzuschreiben. Für die Gewebs- und Zelltherapie sind sie aber vor allem wegen ihres hohen Expressionspotenzials, ihrer Plastizität und ihrer immunsuppressiven Aktivität von hohem Interesse [Rosanski, M. 08. Februar 2012]. Sie sind aber auch fähig, Gewebshormone oder Zytokine auszuschütten [Sack, U. 2016].

Da es sich bei MSCs um eine sehr heterogene Zellgruppe handelt, sind sie grundsätzlich schwer nach einheitlichen Eigenschaften zu charakterisieren. Allerdings wurden von der *International Society of Cellular Therapy* Kriterien aufgestellt, nach denen man MSCs identifizieren kann. Unter anderem müssen *in vitro* kultivierte Zellen die Eigenschaft der Adhärenz und die Differenzierungsfähigkeit in Knochenmarkszellen (Osteozyten/Osteoblasten), Fettzellen (Adipozyten) und Knorpelzellen (Chondrozyten)

aufweisen. Es ist aber auch bekannt, dass MSCs ein Entwicklungspotenzial zu Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), Muskelzellen (Myozyten) und auch Nervenzellen (Neurone) besitzen. Die Differenzierungsrichtung hängt dabei von verschiedenen Regulatoren und Transkriptionsfaktoren (siehe Abbildung 1) ab. Außerdem müssen mindestens 95 % der isolierten Zellen für bestimmte CD-Oberflächenantigene positiv sein. Dazu gehören die Antigene CD105 (Endoglin), CD73 (Ecto5'-nucleotidase) und CD90 (Thyr1) [Kühl, S. & Kühl, M. 2012].

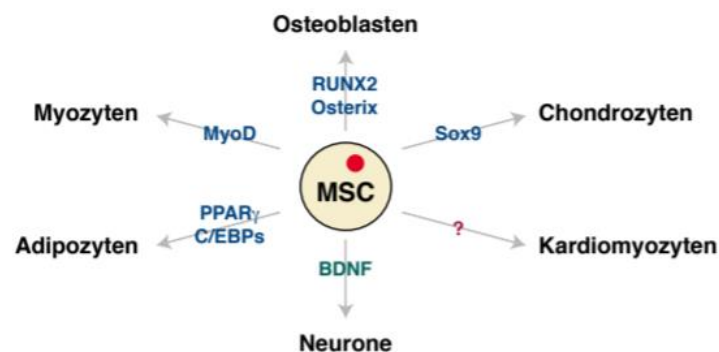


Abbildung 1: Entwicklungspotenzial mesenchymaler Stammzellen [Kühl, S. & Kühl, M. 2012]

Unterscheiden lassen sich MSCs untereinander nach ihrem Proliferations- und Differenzierungspotenzial, aber auch nach dem Vorhandensein von bestimmten Oberflächenmarkern. So zeigen MSCs der Nabelschnur im Vergleich zu MSCs des Knochenmarks ein höheres Potenzial der Zellproliferation [Rosanski, M. 08. Februar 2012]. Im Jahr 2005 wurden MSCs mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) nach ihren unterschiedlichen Oberflächenantigenen charakterisiert, so gelten MSCs mit CD10, CD14, CD24, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD117, CD133, SSEA und HLA-DR als negativ. Gleichzeitig wurden MSCs mit den Oberflächenmarkern CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 und HLA-ABC positiv gemessen [Wagner, W. et al. 2005].

1.1.1 Mesenchymale stammzellähnliche Fibroblasten (FmSCS)

Als dermale bzw. mesenchymale Stammzellen der Haut werden durch Chen, F. G. et al. humane mesenchymale stammzellähnliche Fibroblasten (hFmSCs) (siehe Abbildung 2), Hauptstrukturzellen der Dermis, mit vielfältigem Differenzierungspotenzial bezeichnet.

Diese sind fähig sich in Adipozyten, Osteoblasten, Muskelzellen, endodermale Leberzellen und ektodermale Nervenzellen zu differenzieren [Chen, F. G. et al. 2007]. Charakterisierbar sind sie aufgrund expressionierter Markerproteine wie Nestin, Fibronectin und Vimentin bzw. CD73, CD90, CD105, CD271 und SSEA-4 [Vaculik, C. et al. 2011]. CD90 (Thy1) wird dabei als Fibroblasten-spezifisches Antigen beschrieben, dass vor allem ihre Adhärenz reguliert [Saalbach, A. et al. 1998]. Zusätzlich wurde festgestellt, dass CD90 auch bei Krebszellen eine wichtige Rolle spielt [Kumar, A. et al. 2016]. Bei dermalen Zellen mit CD271 konnte festgestellt werden, dass diese ein erhöhtes Differenzierungspotenzial zu Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten aufweisen [Vaculik, C. et al. 2011]. In Verbindung mit Keratinozyten und Mastzellen stellen sie die Regenerierung der Haut sicher und produzieren dermale Strukturkomponente, wie Glykosaminoglykane, Elastin, Fibronectin, Laminin und Kollagen. Außerdem sind sie für die Produktion von Prostaglandinen, Leukotrien und Zytokine verantwortlich, die für immunologische Prozesse der Haut wichtig sind [Zouboulis, C. 2009].

Als weitere vorkommender Stammzellen in der Haut werden Talgdrüsenstammzellen betrachtet. Da Talgdrüsenzellen einer stetigen Differenzierung ausgesetzt sind, geht man von einer dortigen Quelle an Zellen aus, die Stammzeleigenschaften besitzen [Zouboulis, C. 2009].

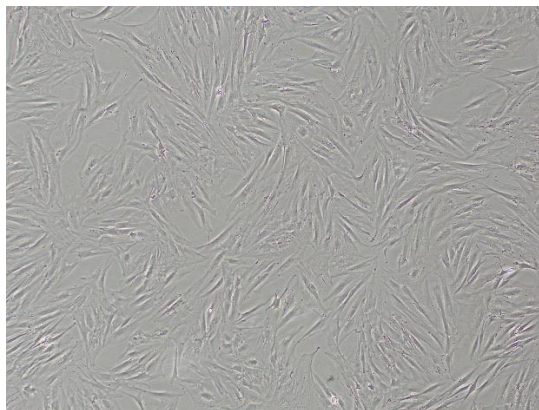


Abbildung 2: Aufnahme dermalen FmSCs mittels Phasenkontrastmikroskop [100-fache Vergrößerung]

1.2 Aufbau der Haut

Die Haut gilt als das größte Organ des Menschen. Sie dient dabei als Schutz gegen schädliche äußere Einflüsse und Regulator des Wärmehaushalts. Zusätzlich nimmt sie Wirkstoffe auf, speichert Wasser, Fett und Salze und scheidet aber auch Stoffwechselprozesse aus. Nebenbei beteiligt sie sich auch an der körpereigenen Vitamin-D-Synthese [URL-1].

Die Haut ist grundsätzlich in drei Schichten aufgebaut: die Epidermis, Dermis und Subkutis (siehe Abbildung 3). Die oberste Schicht ist die Epidermis, auch Oberhaut genannt [URL-1]. Diese besteht aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, was wiederum aus den Schichten *Stratum basale* (Basalschicht), *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* (Hornschicht) besteht. Zu den darin befindlichen Zellen zählen vor allem Keratinozyten, Melanozyten, die Langerhans-Zellen und die Merkel-Zellen [Cerroni, L. et al. 2016]. Die Keratinozyten bilden dabei den größten Anteil in der Epidermis. Einerseits sichern sie mit dermalen Stammzellen im *Stratum basale* die Selbsterneuerung der Haut, andererseits wird durch sie eine schützende Hornschicht in dem *Stratum corneum* [Rosanski, M. 08. Februar 2012] sichergestellt. Da die Epidermis nicht mit Blutgefäßen durchzogen wird, muss die grundsätzliche Versorgung durch Diffusion über die Dermis geschehen [Cerroni, L. et al. 2016].

Als stabile Verankerung der Epidermis befindet sich zwischen dieser und der darunterliegenden Dermis die dermo-epidermale Junctionszone. Sie ist aus einer komplexen Basalmembran, synthetisiert durch basale Keratinozyten und dermalen Fibroblasten, aufgebaut [Cerroni, L. et al. 2016].

Unterhalb dieser Junctionszone tritt die Dermis auf, auch Lederhaut/*Corium* genannt. Sie wiederum besteht aus dermalen Zellen (Fibroblasten, dermale dendritische Zellen und Mastzellen), Bindegewebe (kollagenen und elastischen Fasern) und gelartiger Grundsubstanz (Mukopolysaccharide) [Cerroni, L. et al. 2016].

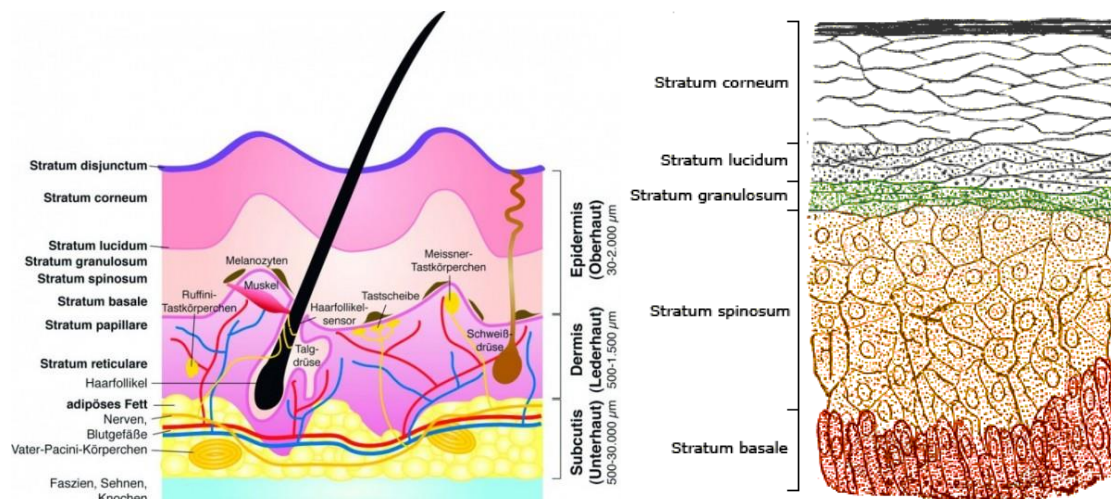


Abbildung 3: Schichten der Haut im Querschnitt [URL-9]

Außerdem wird in sie das schmale, dermal zugewandte *Stratum papillare* (Papillen- oder Zapfenschicht) sowie dem breiteren *Stratum reticulare* (Netzschicht), das bis in das Fettgewebe reicht unterteilt [Cerroni, L. et al. 2016]. Innerhalb beider Schichten befinden sich verschiedene Zelltypen, wie mesenchymale Stammzellen, Fibroblasten, Mastzellen, Histozyten, Makrophagen, aber auch Leukozyten und Lymphozyten [Rosanski, M. 08. Februar 2012]. Durch sie wird die mechanische Stabilität und reversible Verformung der Haut sowie die Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen gesichert [Cerroni, L. et al. 2016].

Die Subkutis (die Unterhaut), die dritte Schicht der Haut wird hauptsächlich aus Fettgewebe zusammengesetzt, die aus Adipozyten besteht [Cerroni, L. et al. 2016].

Letztendlich gehören zur Haut auch Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Talgdrüsen, ekkrine und apokrine Schweißdrüsen und Nägel [Cerroni, L. et al. 2016].

1.3 Zytokine

Als Zytokine werden regulatorische Proteine und Peptide bezeichnet. Sie sind grundsätzlich für die Signalübertragung zwischen Zellen verantwortlich [URL-2]. Dabei bilden sie einerseits eine zentrale Gruppe von Botenstoffen des Immunsystems, wobei sie Immunreaktionen und den Prozess der Entzündung regulieren [Resch, K. et al. 2010] und steuern andererseits die Differenzierung und Proliferation von Immunzellen [URL-2] fungierend als Aktivierungs- und Wachstumsfaktoren [Resch, K. et al. 2010]. Ihre biologische Wirkung wird vor allem durch Bindung an „hochaffine Rezeptoren der

Plasmamembran“ hervorgerufen. Gleichzeitig besitzen sie eine pleiotrope Funktion. So können Zytokine an verschiedenen Zellen wirken und dort unterschiedliche Reaktionen erzeugen [Resch, K. et al. 2010].

Insgesamt sind Zytokine eine inhomogene Gruppe von Proteinen und Peptiden [URL-2], zu denen unteranderen Interleukine (IL), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) aber auch Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF) Interferone und Chemokine [Resch, K. et al. 2010].

1.3.1 Erythropoetin (EPO)

Erythropoetin ist der wichtigste hämapoetische Wachstumsfaktor, der die Produktion der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) reguliert und gleichzeitig nur spezifisch für die Vorläuferzellen dieser Zellen wirkt. Prinzipiell wird die Synthese von EPO durch Hypoxie bekräftigt und somit die Produktion der Erythrozyten im Blut [Krantz, S. B. 1991].

Als Glykoprotein wird EPO während der fetalen Entwicklungsphase in der Leber [Bunn, H. F. 2013] und später hauptsächlich in der Niere [Krantz, S. B. 1991], durch peritubuläre Nierenkapillarzellen produziert [Resch, K. et al. 2010]. Die EPO-Synthese wird aber auch durch Milz [Tan, C. C. et al. 1992] und Haarfollikeln [Bodó, E. et al. 2007] erweitert.

Das endogene Erythropoetin besteht grundsätzlich aus vier, durch Schleifen verbundenen, amphipathischen α -Helices (siehe Abbildung 4), die aus einer 166-Residuen langen Polypeptid bestehen [Bunn, H. F. 2013] und eine Größe von 30 kDa aufweist [Jelkmann, W. & Metzen, E. 1996]. Der Kohlenhydratanteil beträgt etwa 40 % des Polypeptids, was zwar die biologische Aktivität geringer Maßen beeinträchtigt, jedoch eine verlängerte Zirkulation mit einer Halbwertszeit von ca. 7 bis 8 h im Plasma sicherstellt [Bunn, H. F. 2013].

Die Produktion der Erythrozyten wird einer Signal-Transduktions-Kaskade aufgrund der extrazellulären Bindung von EPO an seinen Rezeptor EpoR (siehe Abbildung 5) auf der Oberfläche erythroider Progenitorzellen im Knochenmark vorausgesetzt. Dadurch werden die beiden am EpoR gebundenen Monomere im Zytosol der Zelle zusammengezogen, wodurch sich die daran befindlichen JAK2-Kinasen phosphoryliert werden können, und die Signal-Transduktions-Kaskade initiiert wird [Bunn, H. F. 2013].

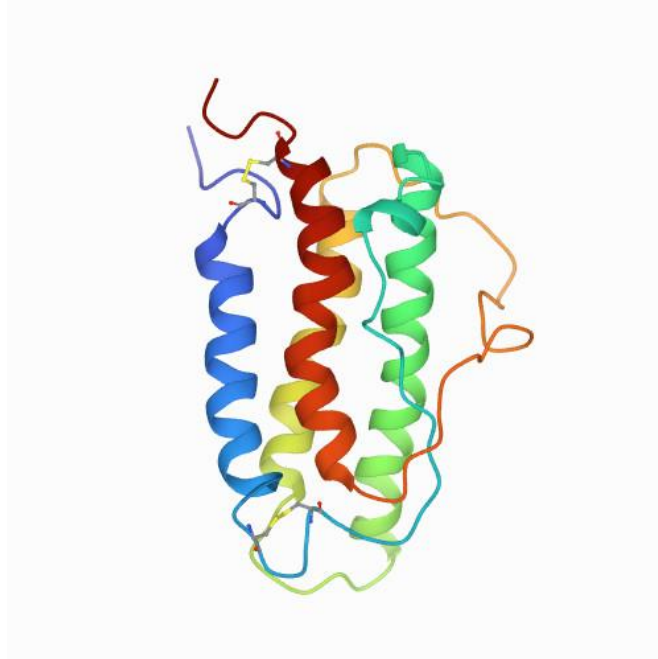


Abbildung 4: Struktur des Erythropoetin [Cheetham, J. C. et al. 1998]

Das endogene Erythropoetin besteht aus vier durch Schleifen verbundenen amphipathischen α -Helices, die aus einer 166-Residuen langen Polypeptid bestehen [Jelkmann, W. et al. 2008] und eine Größe von 30 kDa aufweist [Bunn, H. F. 2013].

Inzwischen sind neben der Erythrozytenproduktion weitere biologische Wirkungen durch EPO bekannt. So wurde auch auf FmSCs der Rezeptor EpoR für EPO identifiziert. In Verbindung mit Trauma-Zytokinen wie IL-6 IL-1 β und TNF α , konnte so festgestellt werden, dass EPO das Zellwachstum dieser Stammzellen verstärkt und somit die Regeneration der Haut bei deren Wunden unterstützt [Bader, a. et al. 2011].

Auch im Gehirn konnten EPO und dessen Rezeptor in Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen nachgewiesen werden. So wird davon ausgegangen, dass dort EPO eine parakrine Funktion ausführt [Bunn, H. F. 2013]. Weitere Untersuchungen zeigten auch eine mögliche Rolle von EPO bei einer verstärkten Neubildung von Blutgefäßen, aufgrund einer biologischen Wirkung auf endotheliale Vorläuferzellen [Bahlmann, F. H. et al. 2004].

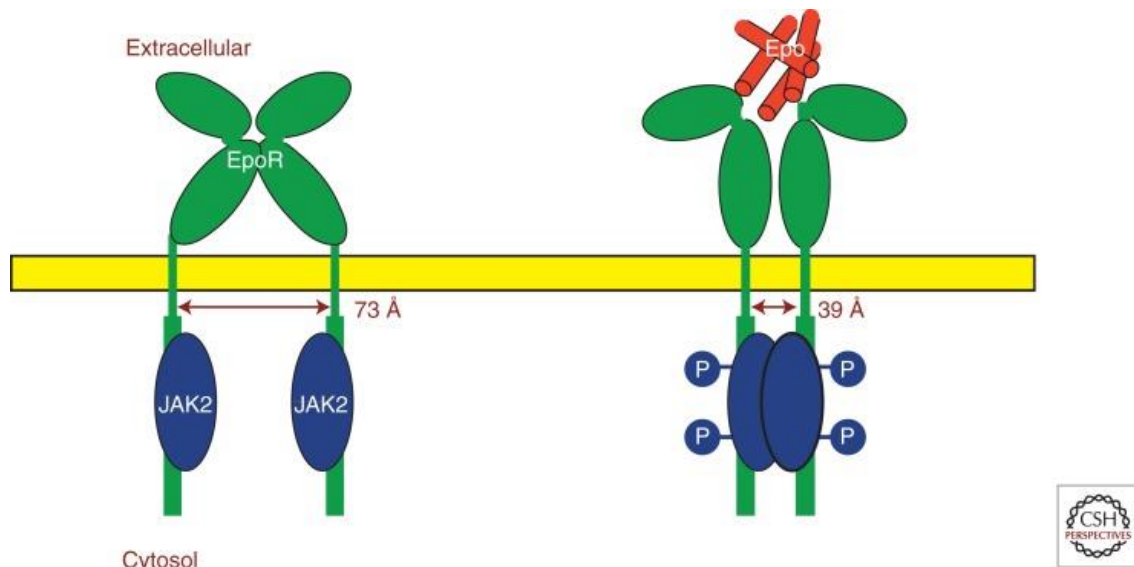


Abbildung 5: Bindung von EPO an EpoR [Bunn, H. F. 2013]

Der Rezeptor des EPO (EpoR) ist ein homodimerer Transmembranrezeptor. Durch die extrazelluläre Bindung des EPOs ziehen sich die Monomere im Zytosol der Zelle zusammen. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung der JAK-2-Kinasen und eine Signal-Transduktions-Kaskade zur Produktion von Erythrozyten eingeleitet [Bunn, H. F. 2013].

Letztendlich wird EPO auch in der Behandlung vieler Krankheiten wie Krebs [Jelkmann, W. et al. 2008], Malaria [Bienvenu, A.-L. et al. 2008], diabetische Retinopathie [Watanabe, D. et al. 2005] oder durch chronischer Nierenerkrankung entstandene Anämie [Jelkmann, W. & Metzner, E. 1996] eingesetzt. Die meiste Bekanntheit erlangte das Medikament EPO als Dopingmittel im Sport. Aufgrund seiner biologischen Funktion der Produktion von Erythrozyten steigt bei medikamentöser Zufuhr das Gesamtvolumen der roten Blutzellen, wodurch die Sauerstofftransportkapazität und gleichzeitig auch die Ausdauerleistungsfähigkeit der Sportler erhöht werden. So wurden seit 1976 immer wieder Leistungssportler nach Wettkämpfen des Dopings mit EPO bezichtigt [URL-3].

1.3.2 Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α

Das Protein TNF α (siehe Abbildung 6) gehört zu der Protein-Superfamilie der tumor necrosis factor superfamily-Liganden (TNFSFL), die zum Großteil als Typ-2-Membranproteine synthetisiert werden. So wird auch TNF α als Transmembranprotein gebildet, und durch Proteolyse zu löslichen TNF α abgespalten. Die Synthese findet dabei hauptsächlich in Monozyten statt. Aber auch viele andere Zellen können TNF α herstellen [Resch, K. et al. 2010].

TNF α ist ein Proteintrimer [Idriss, H. T. & Naismith, J. H. 2000] welches an die Rezeptoren TNF-R1 (p55 oder p60-Rezeptor [Resch, K. et al. 2010], 55 kDa [Idriss, H. T. & Naismith, J. H. 2000]) und TNF-R2 (p75 oder p80-Rezeptor [Resch, K. et al. 2010], 75 kDa [Idriss, H. T. & Naismith, J. H. 2000]) bindet, wodurch Signale in die Zelle weitergeleitet werden können und eine Reaktion hervorruft [Resch, K. et al. 2010]. Beide Rezeptoren treten auf den meisten Zellen auf. Die Affinität, mit der TNF α gebunden wird, ist dabei sehr hoch [Idriss, H. T. & Naismith, J. H. 2000].

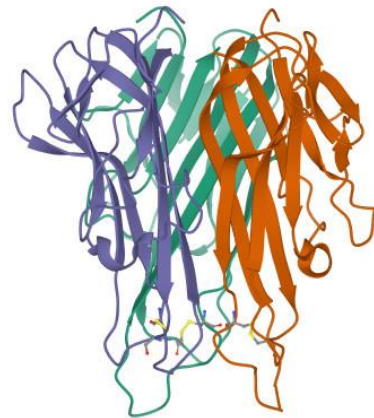


Abbildung 6: Struktur des Proteins TNF α (PDB: 6RMJ) [Degano, M. & Garau, G. 2019]

Das Zytokin TNF α besteht aus einem 163-Residuen langen Proteintrimer. Durch Bindung an seine Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 wird eine Reaktion in der Zelle hervorgerufen [Idriss, H. T. & Naismith, J. H. 2000].

Die biologische Funktion von TNF α ist grundsätzlich sehr vielfältig, wobei die meisten Effekte durch Bindung an TNF-R1 hervorgerufen werden, wie beispielsweise das Auslösen einer Apoptose von Tumorzellen [Resch, K. et al. 2010]. Seine Wirkmechanismen sind aufgrund verschiedenster Signalwege sehr komplex, wodurch TNF α teilweise widersprüchliche Aufgaben erfüllt [Idriss, H. T. & Naismith, J. H. 2000]. Hauptsächlich aber spielt TNF α als Zytokin vor allem bei Immun- und Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle, wobei es genauso wie EPO eine pleiotrope Funktion sowie proinflammatorische Eigenschaft aufweist [Resch, K. et al. 2010]. Dabei soll TNF α gegen einige Arten von Infektionen sogar Resistenzen ausbilden können.

Seinen Namen verdankt TNF seinen antitumoralen Eigenschaften, wie die unmittelbare Tumorzytotoxizität, Initiation der Antitumorantwort sowie der selektiven Schädigung der Blutgefäße, die den Tumor mit unter anderem Sauerstoff versorgen [Resch, K. et al. 2010]. Trotz dessen ist die therapeutische Anwendung gegenüber Tumoren aktuell nicht möglich, da eine hohe und damit auch erst wirksame Dosis an TNF α für den Patienten toxisch wirkt. Auch klinische Versuche in Kombination mit anderen Zytokinen ergaben bis dato keinen Erfolg [Idriss, H. T. & Naismith, J. H. 2000]. Gleichzeitig ist TNF α aber auch bei der entzündungsbedingten Karzinogenese beteiligt. So kann das Zytokin auch eine Immunreaktion blockieren und das Wachstum, das Überleben, die Differenzierung, die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen fördern [Ghahartars, M. et al. 2020].

1.3.3 Interleukin 6 (IL-6)

Auch Interleukin 6 (siehe Abbildung 7) ist als Zytokin bei Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt. Dabei wird es hauptsächlich durch T-Lymphozyten, mononukleären Phagozyten, Fibroblasten oder anderen Zelltypen gebildet. Die Synthese von IL-6 aktiviert anschließend B- und T-Lymphozyten des Immunsystems oder kann die Proliferation pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen für die Hämatopoese induzieren [Resch, K. et al. 2010].

Die Bindung von IL-6 findet am IL-6-Rezeptor (IL-6-R) statt. Der Rezeptor für IL-6 kann dabei in zwei Formen auftreten. Einerseits als Transmembranrezeptor, welcher an Leukozyten und Hepatozyten exprimiert wird. Andererseits als löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6-R), welcher im menschlichen Serum des Blutes auftritt. Insgesamt besteht der funktionelle Rezeptor aus vier Molekülen, zwei IL-6-Transmembranrezeptoren sowie zwei gp130-Rezeptoren. Aufgrund der Expression von gp130 auf verschiedenen Zellen, kann auch bei IL-6 von einer pleiotopen Funktion gesprochen werden. Auch hier führt die Bindung zu einer folgenden Signal-Kaskade, die für biologische Reaktionen entscheidend sind [Tanaka, T. et al. 2018].

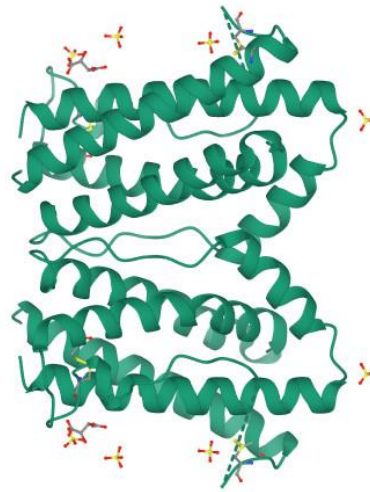


Abbildung 7: Struktur des humanen Interleukin-6 (PDB: 1ALU) [Somers, W. S. et al. 1998]

Das Zytokin Interleukin-6 besteht aus 186 Residuen. Durch eine Schleife und einen Mini-Helix sind seine vier Helix-Ketten miteinander verbunden [Somers, W. S. et al. 1998]. Der funktionelle Rezeptor von IL-6 besteht neben zwei IL-6 Transmembranrezeptoren auch aus zwei gp130-Rezeptoren, die durch Bindung mit IL-6 eine Reaktion auslösen [Tanaka, T. et al. 2018].

Bei Entzündungsreaktionen kann IL-6 einerseits entzündungsfördernd (proinflammatorisch) aber auch entzündungshemmend (antiinflammatorisch) wirken. Dabei führt die Bildung von sekundären Entzündungsmediatoren durch IL-6 zu einer Förderung von Entzündungen. Andererseits hat es die Fähigkeit die Bildung von TNF α in Monozyten/Makrophagen so zu hemmen, dass eine Entzündungsreaktion eingedämmt wird [Resch, K. et al. 2010]. Letztendlich kann jedoch eine übermäßige und dauerhafte Synthese an IL-6 chronische immunvermittelnde Krankheiten auslösen [Tanaka, T. et al. 2018].

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der verschiedenen Trauma-Zytokine TNF α , IL-6 und EPO auf das Transkriptom mesenchymaler Stammzellen, die der Haut entnommen wurden (FmSCs), zu untersuchen. Dazu sollen die Zellen unter der unterschiedlicher Zusammensetzung der Zytokine kultiviert werden, anschließend deren gesamte RNA isoliert und mittels RNA-Seq sequenziert werden, sodass für alle Zellkulturen das gesamte Transkriptom dargelegt wird. Abschließend sollen differentielle Expressionsanalysen jeweils zwischen den Transkriptomen, die unter Einfluss der Zytokine standen, und dem Transkriptom der zytokinfreien Zellen durchgeführt werden. Letztendlich soll dabei speziell der Einfluss der Zytokine auf die Expression krebsassoziiertes Gene sowie eine mögliche Verminderung dieser Gene durch EPO untersucht werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

- β -Mercaptoethanol (AppliChem GmbH, Darmstadt – Deutschland; LOT:40003603)
- BD FACS™ Pre-Sort-Buffer (Becton Dickinson (BD) Pharmingen Inc., San Diego (CA) – USA, LOT: 5267920)
- FcR-Blocking-Reagent, human (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach – Deutschland, LOT: 5170126102)
- PBS-Puffer w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom GmbH, Berlin – Deutschland, LOT: 1439C)
- Trypanblau (Biochrom GmbH, Berlin – Deutschland, LOT: 0263C)

3.2 Medien

- **Zellkultur-Medium**
 - 89 % Dulbecco's Modified Eagles's Medium, GlutaMAX, High-Glucose (Gibro, Carlsbad (CA) – USA, LOT: 2326187)
 - 10 % Fetales Kälberserum (Gibro, Carlsbad (CA) – USA, LOT: 41Q1437K)
 - 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis (MO) – USA, LOT: S43BB9305)

3.3 Molekularbiologische Reagenzien

- CD90⁺-Antikörper: PE Mouse anti-human CD90 (Becton Dickinson (BD) Pharmingen Inc., San Diego (CA) – USA, LOT: 2122811)
- CD271⁺-Antikörper: APC anti-human CD271 (NGFR) Antibody (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach – Deutschland, LOT: 5140627149)
- Erythropoietin – human (Sigma-Aldrich, St. Louis (MO) – USA, LOT: MKBV9446V)

- Interleukin-6 – human (ReliaTech GmbH, Wolfenbüttel – Deutschland, LOT: 1207R10)
- Tumor-Nekrose-Faktor α – human (ReliaTech GmbH, Wolfenbüttel – Deutschland, LOT: 1212R08)
- RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen N.V., Venio – Niederlande, LOT: 157050669)
- Trypsin/EDTA-Lösung 1x (Biochrom GmbH, Berlin – Deutschland, LOT: 0454C)

Tabelle 1: Zusammensetzung der FmSC-Kulturen mit und ohne Zytokine

Ansatz	Kontrollansatz („KA“)	TNF α („TNF α “)	TNF α + IL-6 („IL-6“)	TNF α + IL-6 + EPO („EPO“)
Zellanzahl (UKL001)	75.000	75.000	75.000	75.000
ZK-Medium	12 ml	12 ml	12 ml	12 ml
TNF α (10 ng/ml)	-	120 ng	120 ng	120 ng
IL-6 (10 ng/ml)	-	-	120 ng	120 ng
EPO (20 ng/ml)	-	-	-	240 ng

Tabelle 2: Zusammensetzung der Ansätze zur Vorbereitung der FACS-Analyse

	Ansatz 1 – blank	Ansatz 2 – CD271	Ansatz 3 – CD90	Ansatz 4 – UKL001-P1
Zellanzahl	200.000	200.000	200.000	1.000.000
Pre-Sort-Buffer	9 μ l	8 μ l	80 μ l	80 μ l
FcR-Blocking-Reagent	1 μ l	1 μ l	10 μ l	10 μ l
PE Mouse anti-human CD90	-	-	0,25 μ l	0,25 μ l
APC anti-human CD271 (NGFR) Antibody	-	1 μ l	-	10 μ l

3.4 Material

- 96-Well-Platte (Becton Dickinson Labware – New Jersey, USA)

-
- Falcon[®] Zellkulturflaschen – 175 cm² (Corning[®], New York – USA, LOT: 4166029)
 - Falcon[®] Zellkulturflaschen – 75 cm², (Corning[®], New York – USA, LOT: 8190013)
 - Neubauer-Zählkammer – 0,001 mm Tiefe, 0,0025 cm² (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe – Deutschland)

3.5 Geräte

- Brutschrank, Cytoperm 2 (Heraeus, Hanau – Deutschland)
- FACS – Messgerät, LSR Fortessa[™] Cell Analyzer (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes (NJ) – USA)
- Freezer (-86 °C), Forma 89000Series (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA) – USA)
- Kryotank, Cryoplus 2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA) – USA)
- Lichtmikroskop, ECLIPSE TE2000-S (Nikon, Minato – Japan)
- Nano-Drop, ND-1000 Spectrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen – Deutschland)
- Phasenkontrastmikroskop, IX51 (Olympus, Hamburg – Deutschland)
- Pipetus (Hirschmann-Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt – Deutschland)
- RNA-Sequenzierer, Illumina, HiScanSQ (Illumina, San Diego (CA) – USA)
- Sterilwerkbank, HeraSafe (Heraeus, Hanau – Deutschland)
- Vortexer, MS2 Minishaker (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen – Deutschland)
- Wasserbad, GFL (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel – Deutschland)
- Zentrifuge, Labofuge 400R (Heraeus, Hanau – Deutschland)
- Zentrifuge, Biofuge fresco (Heraeus, Hanau – Deutschland)

4 Methoden

Alle verwendeten Zellkultur (ZK) - Medien, die Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS-Puffer) sowie die Trypsin/EDTA-Lösung wurden im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Außerdem wurden die für die Zellkultur verwendete Materialien durch Autoklavieren sterilisiert. Die Verwendung der Zentrifuge erfolgte jeweils 5 min bei 1800 rpm und 21 °C. Die Zellkulturen wurden dauerhaft in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂-Luftgehalt und 90 % Feuchtigkeit aufbewahrt.

Bei der verwendeten Zellkultur handelte es sich um eine humane FmSC-Zelllinie, die mittels FACS-Analyse nach das Auftreten der Oberflächenantigene CD90⁺/CD271⁺ sortiert wurden. Diese Zellen wurden anschließend kryokonserviert und als UKL001 bezeichnet.

4.1 Rekultivierung der FmSCs UKL001

Die in 1 ml Kryomedium eingefrorenen Zellen wurden aus dem Kryotank entnommen und zu Anfang langsam im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde anschließend in 20 ml ZK-Medium in einem 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mithilfe der Zentrifuge gewaschen, um die Zellen von dem für sie toxischen DMSO (Dimethylsulfoxid) zu entfernen. Der entstandene Überstand wurde daraufhin abgesaugt und das Zellpellet wiederum in 12 ml ZK-Medium resuspendiert. Abschließend wurde die Suspension in eine 175 cm²-Zellkulturflasche (ZKF) überführt, die in den Inkubator gelegt wurde. Alle drei bis vier Tage wurde außerdem ein Mediumwechsel durchgeführt.

4.2 Passagieren der Zellkulturen

Die Gewinnung der Zellen erfolgte durch Trypsinieren. Dazu wurde das gesamte Medium entfernt und im nächsten Schritt die Zellen mit 10 ml (75 cm²-ZKF) bzw. 20 ml (175 cm²-ZKF) PBS-Puffer gewaschen. Der PBS-Puffer wurde ebenfalls abgesaugt. Das Waschen mit PBS wurde daraufhin ein wiederholt. Um die adhärenen Zellen vom Boden der ZKF zu lösen, wurden 2 ml der 1x Trypsin/EDTA-Lösung bei einer 75 cm²-ZKF bzw. 5 ml

bei einer 175 cm²-ZKF zu den Zellen hinzu pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 37 °C inkubiert und der Ablöseprozess unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Gegebenenfalls musste der Vorgang um eine Minute verlängert werden, wenn die Menge nicht-abgelöster Zellen zu hoch war. Der Vorgang des Trypsinierens wurde danach durch Zugabe von 10 ml bzw. 20 ml serumhaltiges ZK-Medium abgestoppt. Das entstandene Zellsuspensat wurde daraufhin in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zugabe des Mediums in die ZKF und Überführung in den Reaktionsgefäß wurde ein zweites Mal wiederholt. Nach 5 min Zentrifugieren des Zellsuspension wurde daraufhin das gesamte Medium abgesaugt. Für das anschließende Auszählen der Zellen wurde das Pellet dann in 1 ml ZK-Medium resuspendiert.

4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop. Dazu wurden 10 µl der Zellen mit 90 µl Trypanblau angefärbt. Es wurden alle Zellen in den vier bzw. acht Quadraten ausgezählt und die Zellzahl pro Milliliter wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

4.4 Vorbereitung der FACS-Analyse

Zur Charakterisierung der Zellen UKL001 und um zu überprüfen, inwieweit der Anteil an CD271 der Zellen erhalten geblieben ist, wurde zusätzlich eine FACS-Analyse nach den Oberflächenantigenen CD90⁺ und CD271⁺ durchgeführt.

Zur Vorbereitung dieser FACS-Analyse mussten zu Anfang die zu untersuchenden Zellen rekultiviert werden (siehe 4.1 *Rekultivierung der FmSCs UKL001*). Die Zellkulturen wurden insgesamt über eine Woche bei 37 °C inkubiert, während alle drei bis vier Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

Wurde die Konfluenz in den ZKF erreicht, wurden die Zellkulturen trypsiniert (siehe 4.2 *Passagieren der Zellkulturen*) und anschließend ihre Lebendzellzahl (siehe 4.3 *Bestimmung der Lebendzellzahl*) bestimmt. Je nach gewünschter Zellmenge wurden entsprechende Volumen aus den 1 ml Zellsuspension, die bei der Bestimmung der

Lebendzellzahl entstehen, entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Insgesamt wurden vier Ansätze (siehe Tabelle 2) erstellt. Da die Zellen sich noch im ZK-Medium befanden, wurden alle Reaktionsgefäße bei 1.500 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert.

Ab diesen Moment wurden alle weiteren Schritte bei 4 °C auf Eis durchgeführt, sodass verhindert wird, dass es zu unspezifischen Bindungen an den Zellen sowie Bindungen zwischen den Zellen selbst kommen kann. Nach der Zentrifugation wurde das ZK-Medium abgesaugt und die Zellen in Pre-Sort-Buffer aufgenommen (Tabelle 2). Um für die CD-Antikörper unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde zusätzlich FcR-Blocking-Reagenz hinzu pipettiert. Nachdem die Ansätze kurz herunter zentrifugiert wurden, inkubierten die Zellen für 10 min bei 4 °C. Anschließend wurden den Ansätzen die entsprechenden Antikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen für CD90 und CD271 hinzugegeben. Nach 10 min inkubieren bei 4 °C, wurden jeweils 1 ml des Pre-Sort-Buffer hinein pipettiert und wieder bei 1.500 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Schlussendlich wurde der Überstand in den Ansätzen abgesaugt, die Zellen in 0,5 ml Pre-Sort-Buffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt, die bis zur Durchführung der FACS-Analyse bei 4 °C aufbewahrt wurden.

4.5 FACS-Analyse

Mit den verschiedenen Passagen der beiden Zelllinien wurde eine FACS-Analyse nach den Oberflächenantigenen CD90⁺ und CD271⁺ durchgeführt. Dabei passierten die je nach Oberflächenantigene Fluoreszenz-markierten Zellen einen Laserstrahl, der sowohl die Zellgröße durch quantitative Messungen des Vorwärtstreulichts (FCS, engl.: Forward Scatter) sowie die Granularität durch quantitative Messungen des Seitwärtstreulichts erfasst (SSC, engl.: Side Scatter) als auch die entsprechenden Fluoreszenzsignale emittiert [Shapiro, H. M. 2003]. Dadurch wurden die Zellen von dem FACS-Messgerät nach Zellen sortiert, die nur CD90, CD271 oder beide Oberflächenmarker besitzen.

4.6 Kultivieren der FmSCs UKL001 mit den Zytokinen EPO, TNF α und IL-6

Für die Kultivierung der Zellen UKL001 mit den verschiedenen Zytokinen wurden diese nach der Reaktivierung (siehe 4.1 *Reaktivierung der FmSCs UKL001*) passagiert (siehe

4.2 *Passagieren der Zellkulturen*) und ihre Lebendzellzahl (siehe 4.3 *Bestimmung der Lebendzellzahl*) bestimmt. Anschließend wurden pro Zellkultur 12 ZKF (75 cm²) mit je 75.000 Zellen angesetzt. Aus diesen 12 ZKF wurden mit je drei ZKF vier Ansätze initiiert (siehe Tabelle 1) und anschließend kultiviert.

Der erste Ansatz entspricht der Kontrollgruppe (weiterführend mit „KA“ bezeichnet) und wurde ohne jeglichen Zusatz standardgemäß mit 12 ml ZK-Medium kultiviert. Der zweite Ansatz (weiterführend mit „TNF α “ bezeichnet) wurde mit zusätzlichen 10 ng/ml TNF α pro ZKF kultiviert. Dem Medium des dritten Ansatzes jeder ZKF (weiterführend mit „IL-6“ bezeichnet) wurden 10 ng/ml TNF α und 10 ng/ml IL-6 hinzugegeben. Im vierten Ansatz (weiterführend mit „EPO“ bezeichnet) wurden schlussendlich die Zellen neben den 10 ng/ml TNF α und 10 ng/ml IL-6 zusätzlich mit 20 ng/ml EPO kultiviert (siehe Tabelle 1). Der Tag der Aussaat wurde dabei als Tag 0 angesehen. An Tag 2 und Tag 4 wurden ein Mediumwechsel durchgeführt, bis an Tag 6 die Zellen geerntet wurden.

Während der Zellernte wurden die Zellen in den jeweiligen ZKF, wie in 4.2 *Passagieren der Zellkulturen* beschrieben, trypsiniert und anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation wurde die flüssige Phase vom Zellpellet entfernt. Um die Zellen zu waschen, wurden das Zellpellet in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde die Suspension erneut zentrifugiert und die flüssige Phase erneut abgenommen. Schlussendlich wurden die Zellen kurzzeitig in flüssigen Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C in einem Freezer gelagert.

4.7 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit allen Probenansätzen aus Tabelle 1 nach der Anleitung des RNeasy® Plus Mini Kits (siehe Anhang A). Dazu wurden die Proben nach Entnahme aus der -80 °C-Umgebung zunächst auf Eis aufbewahrt. Für eine erfolgreiche Isolation der RNA aus den Zellen wurde außerdem β -Mercaptoethanol dem Lyse-Puffer „RLT Plus Puffer“ hinzu pipettiert. Nach der Homogenisierung der Zellen im RLT Plus Puffer (siehe Anhang, A, 2. *Disrupt the cells by adding Buffer RLT Plus.*) wurde zusätzlich die Suspension 20-mal in eine 1 ml Spritze aufgenommen und wieder abgegeben, um die Zellen vollständig zu zerstören. Erst danach wurde Schritt 3 der Anleitung fortgefahren.

4.7.1 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit der Proben

Um zu überprüfen, ob die RNA-Isolation erfolgreich war, wurde die Menge der isolierten RNA und die Reinheit der Proben mit den Indikatoren A260/A280 sowie A260/A230 mittels UV-Spektroskopie durch Nano-Drop bestimmt. So gelten RNA-Proben als allgemein proteinfrei, wenn das Absorptionsverhältnis von 260/280 bei etwa 2 liegt. Außerdem kann man bei RNA-Proben von reinen Proben, frei von organischen Verbindungen sprechen, wenn eine Spektralphotometrische Messung einen Wert im Bereich von 2,0 – 2,2 aufweist [URL-4]. Für diese spektrometrische Messung wurde jeweils 1 µl der Proben verwendet.

4.8 Analyse des Transkriptoms mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Die Analyse des Transkriptoms der FmSCs wurde durch die DNA Core Unit der Universität Leipzig durchgeführt. Dazu wurde die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) mittels Illumina HiScanSQ durchgeführt.

Bei dieser RNA-Seq handelt es sich um eine noch neue Deep-Sequencing-Technologie. Dabei wurde aus der gesamten RNA der Zellen eine Bibliothek aus cDNA-Fragmenten gebildet. Diese cDNA-Fragmente erhielten anschließend an beiden Enden Adaptoren. Daraufhin wurden diese cDNA-Fragmente mittels dem Hochdurchsatzverfahren sequenziert [Wang, Z. et al. 2009], wodurch die Sequenzierung mehrerer DNA-Moleküle möglich ist [Baumann, S. & Jochum, W. 2018]. Die dabei entstandenen Sequenzen können von einem Ende (Single-End-Sequenzierung) aus oder aber auch von beiden Enden (Pair-End-Sequenzierung) gebildet werden und zwischen 30 und 400 bp groß sein. Nachdem die gebildeten Sequenz-Reads mit dem Transkriptom abgeglichen wurden, wurden diese zusätzlich in die drei Typen exonische Reads, Junction-Reads und Poly(A)-End-Reads eingeteilt und es konnte ein Expressionsprofil für jedes Gen erstellt werden [Wang, Z. et al. 2009].

4.9 Differentielle Expressionsanalyse

Zur Quantifizierung exprimierter Gene der Zellproben wurde eine differentielle Expressionsanalyse durchgeführt, bei der zuerst die aus der RNA-Seq entstandenen Daten in die Programmiersprache R eingelesen und anschließend Gene, die nicht bzw. konsistent sehr wenig exprimiert wurden, aus weiteren Analysen entfernt. Mithilfe der TMM (trimmed mean of M values) - Methode, einer Methode zur Schätzung relativer

RNA-Produktionsmengen aus Daten der RNA-Seq [Robinson, M. D. & Oshlack, A. 2010], wurden die Werte für die verbliebene Gene normalisiert. Folgend wurden die Werte mit der logCPM (log counts per million) - Funktion in logarithmische Werte umgewandelt. Mit diesen Werten konnte dann die differentielle Expression mittels R-bezogener limma-trend-Methode und einer entsprechenden contrast-Matrix bestimmt werden. Somit ließ sich für jedes Gen ein lineares Modell für die Expression errechnen und mit einer empirischen Bayes-Methode die Wahrscheinlichkeiten für die Ergebnisse bestimmen. Nicht-signifikante Ergebnisse wurden dabei aussortiert. Abschließend wurden die Gene mithilfe des „DAVID“ (database of annotation, vialisation and integrated discovery) - Onlinetool gegen eine ontologische Gendatenbank verglichen. Bei dieser differentiellen Expressionsanalyse wurden die Ansätze TNF α , IL-6 und EPO mit dem Kontrollansatz KA gegenübergestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der FmSCs UKL001 mittels Durchflusszytometrie

Für die Charakterisierung der FmSCs UKL001 wurde zusätzlich eine FACS-Analyse nach den Oberflächenantigenen CD90⁺ und CD271⁺ durchgeführt. Da die Zellen vor ihrer Kryokonservierung nach CD90⁺/CD271⁺-Zellen vorsortiert wurden, soll überprüft werden, inwieweit diese Oberflächenantigene für den Versuch erhalten geblieben sind.

Dazu wird in Abbildung 8 einerseits die Verteilung der Zellen mittels Dot-Plot dargestellt (Abbildung 8 (A)), die entweder das Oberflächenantigen CD90 oder CD271 besitzen bzw. bei denen beide dieser Oberflächenantigene auftreten. Zusätzlich wird dazu die prozentuale Verteilung dieser Zellgruppierungen mittels Balkendiagramm (Abbildung 8 (B)) dargestellt.

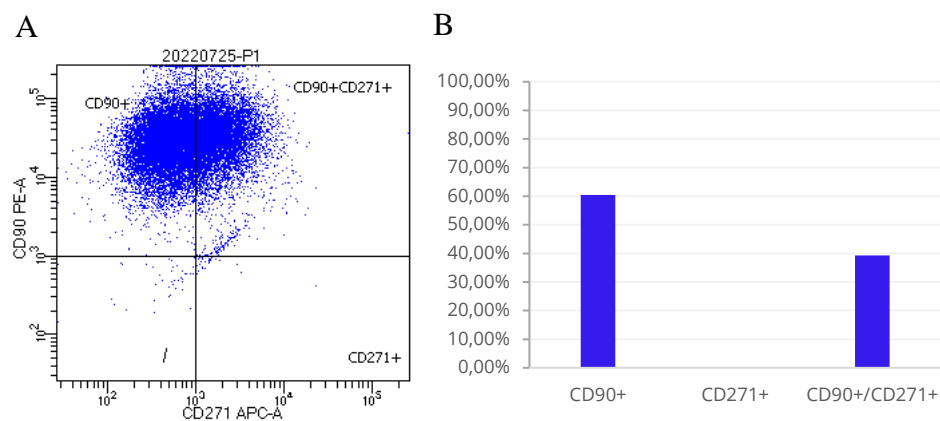


Abbildung 8: Dot-Plot der FACS-Analyse (A) und prozentuale Verteilung (B) der FmSCs

Es erfolgte eine FACS-Analyse der FmSCs UK1001. Dazu wird in Abbildung A das entsprechende Dotplot dargestellt. Dies zeigt, dass so gut wie alle der Zellen CD90 besitzen, wovon ein Teil zusätzlich CD271 trägt. Abbildung B stellt dazu den Anteil von 60,4 % der Zellen, die nur die CD90 aufweisen und den Anteil von 39,3 % der Zellen, die CD90 und CD271 besitzen, in einem Säulendiagramm dar.

Wie in der Abbildung 8 zusehen, besitzen 60,4 % der Zellen nur CD90 und 39,3 % der Zellen neben CD90 auch das Oberflächenantigen CD271. Somit entsprechen aber auch 99,7 % der Zellen, die allgemein CD90 aufweisen. Zusätzlich lassen sich hier 0,1 % der untersuchten FmSCs zu Zellen zuordnen, die nur CD271 aufweisen sollen. Außerdem erscheint auch ein geringer Teil der Zellen im Bereich undefinierter Zellen, die prozentual einem Wert von 0,2 % entsprechen.

5.2 Analyse des Transkriptom der FmSCs UKL001 unter Einfluss der Zytokine TNF α , IL-6 und EPO

Die Analyse des Transkriptom unter Einfluss der Zytokine TNF α , IL-6 und EPO erfolgte mit der Zellkultur dermalen FmSCs UKL001. Aufgrund der Zugabe der Zytokinen in verschiedenen Zusammensetzungen sind pro Zellkultur vier verschiedene Ansätze entstanden (siehe Tabelle 1), die zusätzlich in jeweils drei Proben pro Ansatz aufgeteilt wurden. So sind für jede Zellkultur zwölf Proben entstanden, die ausgewertet werden konnten.

5.2.1 Bestimmung der RNA-Konzentration

Um zu überprüfen, ob die RNA-Isolation für die spätere Analyse erfolgreich war, wurden für die verschiedenen Ansätze der beiden FmSC-Kulturen die Menge der isolierten RNA bestimmt und in Abbildung 9 dargestellt.

Betrachtet man Abbildung 9 treten innerhalb der Ansätze zwischen den einzelnen Proben teilweise recht hohe Schwankungen auf. So ist der Unterschied zwischen den Proben mit der geringsten RNA-Konzentration und mit der höchsten RNA-Konzentration des Ansatzes mit TNF α mit etwa 800 ng/ μ l sehr groß. Auch bei dem Ansatz der drei Zytokine weicht eine Probe stark von den anderen Proben ab.

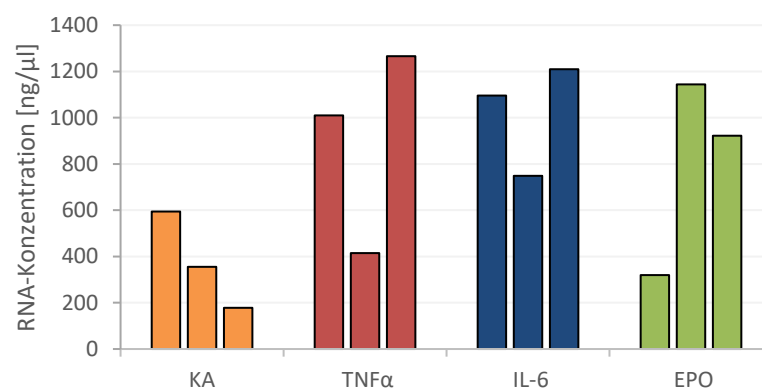


Abbildung 9: Menge der exprimierten RNA in den Ansätzen KA, TNF α , IL-6 und EPO

Es erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration aller Proben der vier Ansätze KA (Kontrollansatz [orange gefärbt]), TNF α (Zellkultur mit TNF α , [rot gefärbt]), IL-6 (Zellkultur mit TNF α und IL-6 [blau gefärbt]) und EPO (Zellkultur mit TNF α , IL-6 und EPO [grün gefärbt]). Insgesamt ist hierbei bei den drei Ansätzen TNF α , IL-6 und EPO eine erhöhte RNA-Konzentration im Gegensatz zu KA dargestellt.

Der Vergleich verschiedenen Ansätze untereinander macht deutlich, dass die höchste RNA-Konzentration des Kontrollansatzes im Vergleich zu den anderen Ansätzen grundsätzlich geringer ist. Die höchsten Konzentrationen der anderen drei Ansätze hingegen weisen ähnliche Mengen an RNA pro μl auf.

5.2.2 Bestimmung der Probenreinheit

Neben der Bestimmung der RNA-Konzentration der verschiedenen Proben, wurde auch die Reinheit derer untersucht. Insgesamt wurde die Proben nach Verunreinigungen durch Proteine mit dem Absorptionsverhältnis 260/280 (siehe Abbildung 10 (A)) sowie durch organische Verbindungen oder chaotrophe Stoffe (siehe Abbildung 10 (B)) mit dem Absorptionsverhältnis 260/230 für alle vier Ansätze der jeweiligen Zelllinien durchgeführt. Die durch die spektralphotometrische Messung entstandenen Ergebnisse sind in den Abbildung 10 (A) und (B) dargestellt.

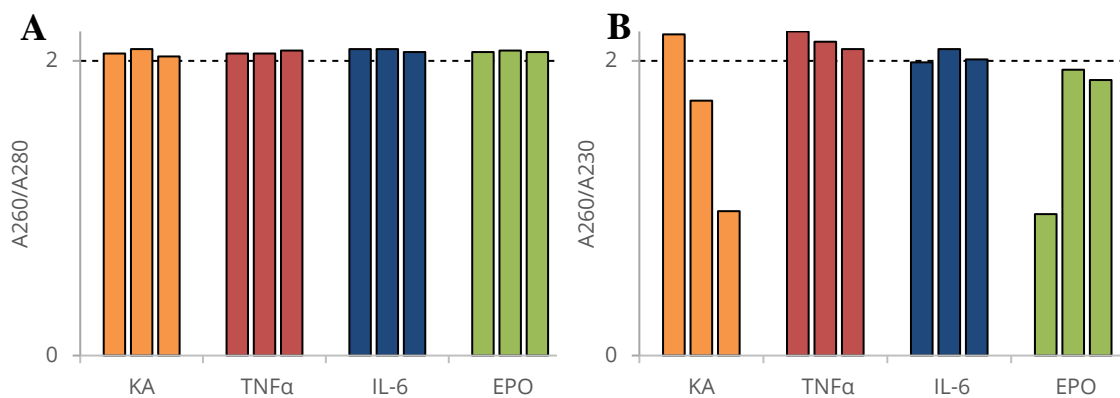


Abbildung 10: Adsorptionsverhältnisse A260/A280 (A) und A260/A230 (B) der Ansätze KA, TNF α , IL-6 und EPO

Es erfolgte die Bestimmung der Probenreinheit mittels Spektralphotometrie der vier Ansätze KA (Kontrollansatz [orange gefärbt]), TNF α (Zellkultur mit TNF α , [rot gefärbt]), IL-6 (Zellkultur mit TNF α und IL-6 [blau gefärbt]) und EPO (Zellkultur mit TNF α , IL-6 und EPO [grün gefärbt]). In Abbildung A wird die Verunreinigung durch Proteine mithilfe des Adsorptionsverhältnis A260/A280 dargestellt, wobei alle Proben über den Grenzwert von 2,0 liegen und somit als proteinfrei gelten. In Abbildung B wird die Verunreinigung der Proben durch organische Verbindungen dargestellt, wobei einige Proben (Ansatz KA, IL-6 und EPO) nicht vollständig von organischen Verbindungen befreit wurden.

Bei den dermalen FmSCs UKL001 weisen alle Proben der vier Ansätze einen Wert über 2,0 des Indikators für Proteinverunreinigungen auf. So besitzen diese außerdem mit Werten zwischen 2,03 und 2,08 keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Probe (siehe Abbildung 10 (A)).

Allerdings konnten bei dieser Zelllinie für den Indikator für Verunreinigung durch organische Verbindungen bei insgesamt sechs Proben ein Wert unter dem spezifischen Wert von 2,0 nachgewiesen werden. Das betrifft unter anderem zwei RNA-Proben des Kontrollansatzes KA, eine Probe des Ansatzes IL-6 und alle drei Proben des Ansatzes EPO. Bei allen anderen Proben wurden Werte zwischen 2,0 und 2,2 bestimmt (siehe Abbildung 10 (B)).

5.2.3 Quantifizierte Ergebnisse der differentiellen Expressionsanalyse

Um eine Quantifizierung von Genen, die unter Einfluss der verschiedenen Zytokinzusammensetzung unterschiedlich stark exprimiert wurden, wurde nach einer RNA-Seq eine differentielle Expressionsanalyse (DE) durchgeführt. Dabei hat man jeweils die Ansätze TNF α , IL-6 und EPO mit dem Kontrollansatz KA gegenübergestellt. Insgesamt konnten, wie in Abbildung 11 dargestellt, durch die differentielle Expressionsanalyse 1270 signifikant mehr oder weniger exprimierte Gene zwischen dem Ansatz TNF α und dem Kontrollansatz KA identifiziert werden. Gleichzeitig wurden davon 707 verschiedene Gene signifikant mehr durch TNF α exprimiert und 563 Gene weniger als im KA. Ähnliche Werte lässt sich durch die DE zwischen IL-6 und KA nachweisen. Hierbei konnte bei 1262 Genen eine signifikant verstärkte bzw. verringerte Expression festgestellt werden, wobei 700 der Gene signifikant mehr bzw. 562 signifikant weniger Gene exprimiert wurden. Letztendlich zeigen die Ergebnisse der DE zwischen den Ansätzen EPO und KA ebenso, wie die anderen Ergebnisse ähnliche Mengen an signifikant mehr oder weniger exprimierter Gene. So konnten hier 1232 verschiedene Gene ermittelt werden. Davon wurden wiederum 697 Gene im Ansatz EPO vermehrt exprimiert und 535 Gene weniger.

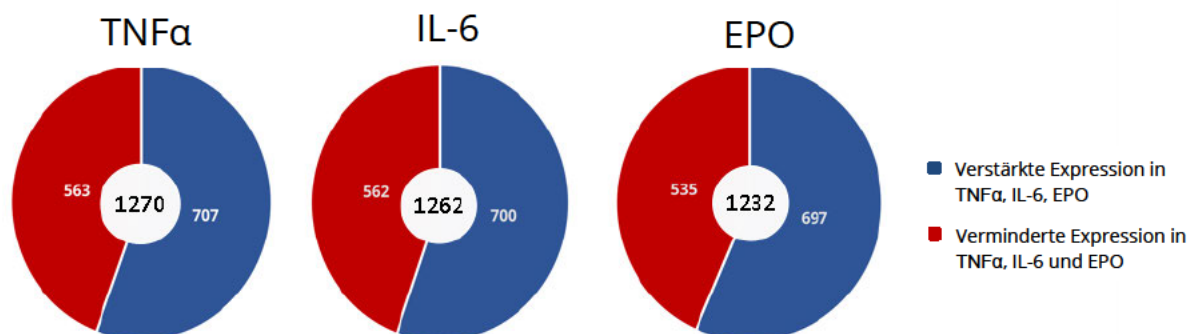


Abbildung 11: Signifikant mehr oder weniger exprimierte Gene

Es erfolgte eine differentielle Expressionsanalyse zwischen den Transkriptomen der drei Ansätzen TNF α (Zellkultur mit TNF α), IL-6 (Zellkultur mit TNF α und IL-6) und EPO (Zellkultur mit TNF α , IL-6 und EPO) gegenüber dem Transkriptom von KA (Kontrollansatz). Der blaugefärbte Ringanteil zeigt die durch TNF α , IL-6 und EPO signifikant mehr exprimierten Gene und der rotgefärbte Ringanteil zeigt die in diesen Ansätzen weniger exprimierten Gene. In TNF α wurden von 1270 Genen 707 Gene verstärkt exprimiert und 563 Gene signifikant weniger. In IL-6 wurden von 1262 Genen 700 Gene verstärkt exprimiert und 562 Gene signifikant weniger. In EPO wurden von 1232 Genen 697 Gene verstärkt exprimiert und 535 Gene signifikant weniger.

So lassen sich bei der Betrachtung der Quantität in der Gesamtheit der Gene sowie bei der Differenzierung zwischen mehr oder weniger exprimierter Gene nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen DE erkennen.

Gleichzeitig ließen sich unter den verschiedenen Genen der drei DE mithilfe des DAVID-Online tools Gene ermitteln, die mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht werden können. Bei Betrachtung von Abbildung 12 erkennt man, dass es sich bei allen drei Expressionsanalysen rund ein Viertel der Gene um krebsassoziierte Gene handelt. Auch hier unterscheiden sich die Anteile an krebsassoziierten bzw. nicht krebsassoziierten Genen nur gering. Allerdings ist der Anteil an krebsassoziierten Genen, die durch die DE identifiziert wurden, zwischen den Ansätzen EPO und KA am größten (27,76 %), während es zwischen TNF α und KA am geringsten ist (24,88 %).

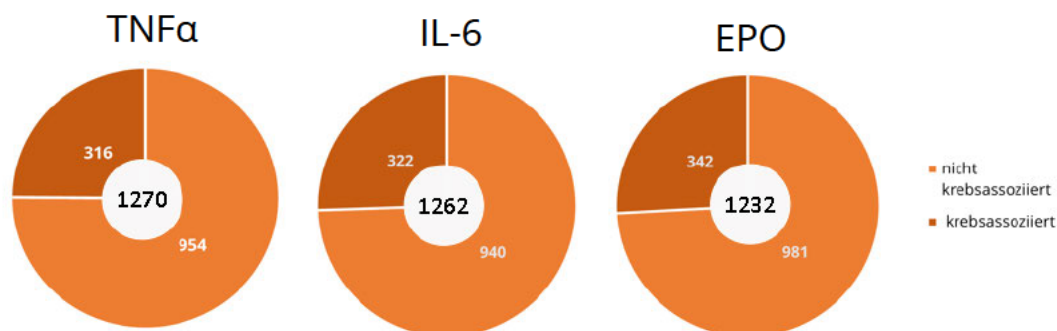


Abbildung 12: Anzahl an krebsassoziierten und nicht krebsassoziierten Genen

Es erfolgte eine differentielle Expressionsanalyse zwischen den Transkriptomen der drei Ansätzen TNF α (Zellkultur mit TNF α), IL-6 (Zellkultur mit TNF α und IL-6) und EPO (Zellkultur mit TNF α , IL-6 und EPO) gegenüber dem Transkriptom von KA (Kontrollansatz). Die braunefarbene Ringanteile entspricht den krebsassoziierten Genen. Der orangegefärbte Ringanteil entspricht den nicht krebsassoziierten Genen. In TNF α konnten von 1270 Genen 316 krebsassoziierte und 954 nicht krebsassoziierte Gene identifiziert werden. In IL-6 konnten von 1262 Genen 322 krebsassoziierte und 940 nicht krebsassoziierte Gene identifiziert werden. In EPO konnten von 1232 Genen 342 krebsassoziierte und 981 nicht krebsassoziierte Gene identifiziert werden.

Auch die krebsassoziierten Gene lassen sich in signifikant mehr oder weniger exprimiert unterteilen. So ist in Abbildung 13 zu sehen, dass in den Ansätzen mit den Zytokinen die Anzahl an verstärkt exprimierten, krebsassoziierten Genen überwiegt. Bei Vergleich von Abbildung 11 und Abbildung 13, stellt man fest, dass im Ansatz TNF α der Anteil an krebsassoziierten und gleichzeitig signifikant verstärkt, exprimierter Gene bei 27,58 % der insgesamt verstärkt exprimierten Genen liegt. Bei IL-6 sind von 700 signifikant erhöht exprimierten Genen 24,57 % krebsassoziierte Gene. Bei EPO ist dieser Anteil letztendlich am höchsten. Dort wurden 28,84 % an krebsassoziierten Genen im Bereich der Gene mit verstärkter Expression ermittelt.

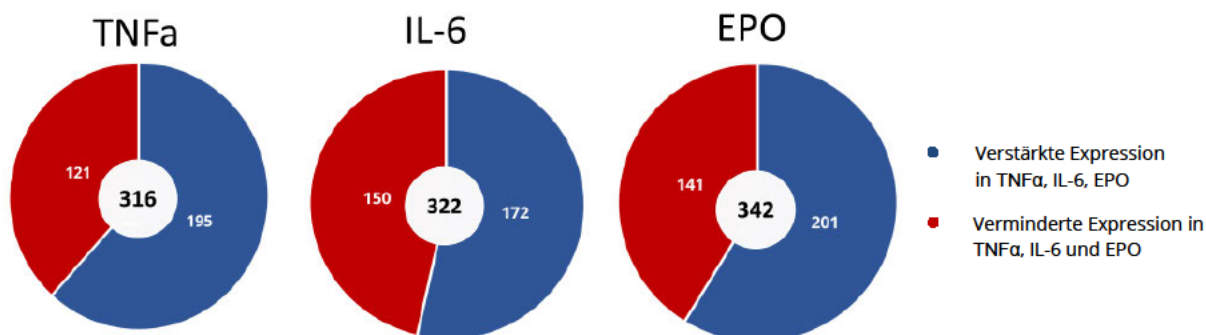


Abbildung 13: Signifikant mehr oder weniger exprimierte, krebsassoziierte Gene

Es erfolgte eine differentielle Expressionsanalyse zwischen den Transkriptomen der drei Ansätzen TNF α (Zellkultur mit TNF α), IL-6 (Zellkultur mit TNF α und IL-6) und EPO (Zellkultur mit TNF α , IL-6 und EPO) gegenüber dem Transkriptom von KA (Kontrollansatz). Der blaugefärbte Ringanteil entspricht den verstärkt exprimierten, krebsassoziierten Genen in TNF α , IL-6 und EPO. Der rotgefärbte Ringanteil entspricht den vermindert exprimierten, krebsassoziierten Genen in TNF α , IL-6 und EPO. In TNF α wurden von 316 krebsassoziierten Genen 196 signifikant mehr exprimierte und 121 signifikant weniger exprimierte Gene identifiziert. In IL-6 wurden von 322 krebsassoziierten Genen 172 signifikant mehr exprimierte und 150 signifikant weniger exprimierte Gene identifiziert. In EPO wurden von 342 Genen 201 signifikant mehr exprimierte und 141 signifikant weniger exprimierte Gene identifiziert.

Vergleicht man die krebsassoziierten Gene, die in den Ansätzen TNF α , IL-6 und EPO gegenüber des Kontrollansatzes signifikant mehr exprimiert wurden, miteinander, so wurden 71 derselben Gene in allen drei Ansätzen verstärkt exprimiert (siehe Abbildung 14).

Jeweils zehn identische krebsassoziierte Gene konnten durch die DE bei IL-6 und EPO gegenüber KA nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu sind es zwischen TNF α und IL-6 dreizehn solcher Gene und mit 79 Genen wurden die meisten identischen Gene zwischen TNF α und EPO gegenüber KA in signifikant erhöhter Expression identifiziert. Letztendlich konnten hierbei auch unterschiedliche signifikant vermehrt exprimierte Gene bei den einzelnen Ansätzen festgestellt werden, wobei die Zahl an diesen Genen bei IL-6 mit 78 individuellen Genen am höchsten und bei TNF α mit 30 am niedrigsten ist (siehe Abbildung 14).

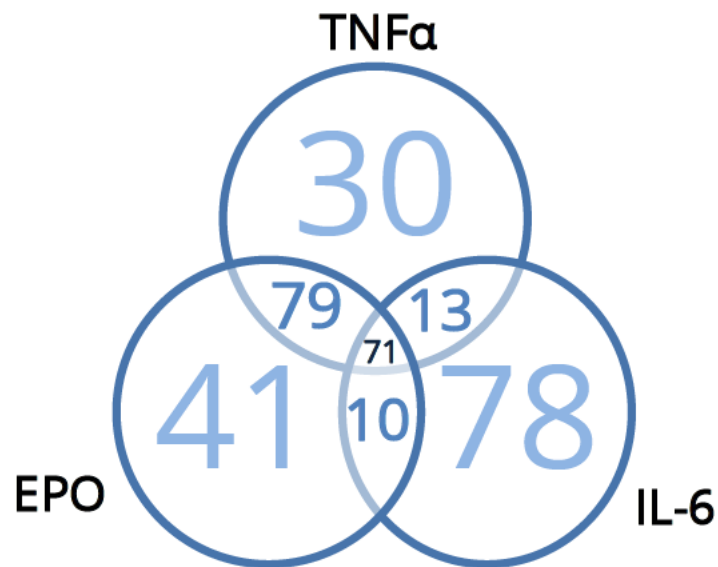


Abbildung 14: VENN-Diagramm zum Vergleich der signifikant erhöhten Expression krebsassoziierter Gene zwischen den Ansätzen TNF α , IL-6 und EPO gegenüber KA

Es erfolgte eine differentielle Expressionsanalyse zwischen den Transkriptomen der drei Ansätzen TNF α (Zellkultur mit TNF α), IL-6 (Zellkultur mit TNF α und IL-6) und EPO (Zellkultur mit TNF α , IL-6 und EPO) gegenüber dem Transkriptom von KA (Kontrollansatz). Zusätzlich wurden die signifikant mehr exprimierten, krebsassoziierten Gene zwischen den Ansätzen TNF α , IL-6 und EPO miteinander verglichen. 71 verschiedene Gene konnten bei allen drei Ansätzen identifiziert werden. Zwischen TNF α und EPO wurden die meisten identischen Gene festgestellt, während IL-6 die meisten Gene identifiziert wurden, die weder bei TNF α noch EPO in signifikant hoher Menge exprimiert wurden.

5.2.4 Qualitative Ergebnisse der differentiellen Expressionsanalyse

Mithilfe der aus der contrast-Matrix errechneten Koeffizienten aus der differentiellen Expressionsanalyse lassen sich die verschiedenen Gene auch nach absteigender Signifikanz ihrer Expression darstellen. So sind dazu in Abbildung 15 diejenigen Gene dargestellt, die in den Ansätzen TNF α , IL-6 und EPO in signifikant hoher bzw. signifikant geringerer Menge gegenüber KA exprimiert wurden. Außerdem wurden hier Gene als signifikant am häufigsten exprimiert angenommen ab einem Koeffizienten-Wert von mindestens 8 bei mindestens einer der drei Ansätze und Gene als am geringsten exprimiert mit einem Koeffizienten-Wert von unter -6, ebenfalls bei mindestens einer der drei Ansätzen. Diese Gene wurden zusätzlich farblich hervorgehoben.

Vergleicht man die signifikant höher exprimierten Gene zwischen den drei Ansätzen miteinander, wurden diese meist in allen drei Ansätzen in hoher Menge exprimiert. Nur

bei wenigen Genen konnte bei einen der beiden Ansätze keine Expression in signifikanter Menge bzw. eine Expression unter dem Wert von 8 ermittelt werden. Die Gene wurden zwar als signifikant mehr exprimiert identifiziert, gehören aber nicht zu den Genen mit der höchsten Expression.

Außerdem ist zu sehen, dass es sich dabei um krebsassoziierte Gene handelt (siehe Abbildung 15, mit * markiert). Die Gene PEDS1-UBE2V1 (nur in TNF α verstärkt exprimiert) und USP18 gehören hingegen als nicht krebsassoziierte Gene zu den meist exprimierten Genen der drei Ansätze. Außerdem ist hierbei auffällig, dass es sich bei 9 der 15 verschiedenen Gene um dieselben Gene handelt, die mit signifikant sehr hoher Menge nachgewiesen wurden. Bei IL-6 konnten zusätzlich die meisten Gene identifiziert werden, die im Vergleich zu KA in einer signifikant hohen Menge exprimiert wurden (siehe Abbildung 15).

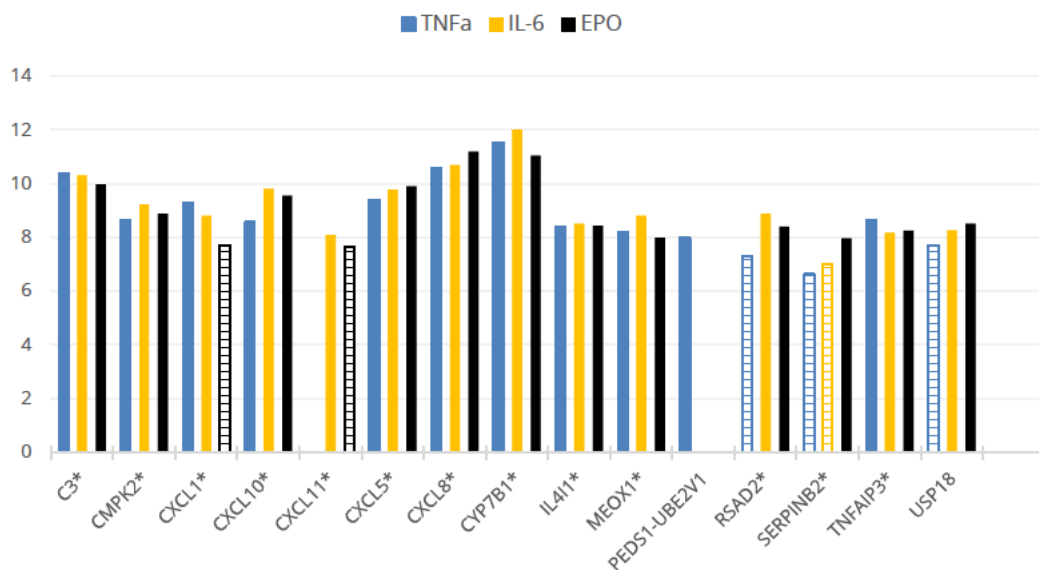


Abbildung 15: Signifikant am meist exprimierten Gene der Ansätze TNF α , IL-6 und EPO gegenüber KA

Es erfolgte eine differentielle Expressionsanalyse zwischen den Transkriptomen der drei Ansätzen TNF α (Zellkultur mit TNF α , [blau gefärbt]), IL-6 (Zellkultur mit TNF α und IL-6, [gelb gefärbt]), und EPO (Zellkultur mit TNF α , IL-6 und EPO, [schwarz gefärbt]), gegenüber dem Transkriptom von KA (Kontrollansatz). Dazu wurden die Gene, mit der der signifikant höchsten Expression ermittelt. Die meisten Gene, wurden in allen drei Ansätzen in der höchsten Menge exprimiert. Außerdem handelt es sich, bis auf zwei Gene um krebsassoziierten Genen.

Das Cytochrom P450 – Gen (CYP7B1) wurde bei TNF α und IL-6 am häufigsten exprimiert, während es bei EPO das Gen für die C-X-C motif Chemokine 8 (CXCL8) betrifft. CXCL8 ist außerdem dabei als zweitmeist exprimiertes Gen durch TNF α und IL-6 zu finden, während CYP7B1 in EPO als zweithäufigsten exprimiert wurde. Folgend sind in Abbildung 15 noch 13 weitere Gene wie beispielsweise Gene für weitere CXC-Chemokine oder auch Interleukin-4 I1 zu finden, die bei mindestens einer der drei Ansätzen in signifikant höchster RNA-Menge exprimiert wurden (siehe Abbildung 15).

6 Diskussion

Im Laufe dieser Arbeit wurde der Einfluss der Trauma-Zytokine TNF α , IL-6 und EPO auf das Transkriptom mesenchymaler Stammzellen untersucht. Dazu erfolgte zu Beginn eine Charakterisierung der FmSCs mittels einer FACS-Analyse. Daraufhin wurden das Transkriptom der verschiedenen Zellproben sequenziert und anschließend eine differentielle Expressionsanalyse des Transkriptom aus den Ansätzen TNF α (Zellkultur unter Einfluss von TNF α), IL-6 (Zellkultur unter Einfluss von TNF α und IL-6) sowie EPO (Zellkultur unter Einfluss von TNF α , IL-6 und EPO) gegenüber dem Kontrollansatz KA, der den „Normalzustand“ des Transkriptoms unter einfacher Kultivierung der Zellen unter definierten Bedingungen darstellt, durchgeführt.

6.1 FACS-Analyse

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um mesenchymale stammzellähnliche Fibroblasten, denen charakteristisch bestimmte Oberflächenantigene wie CD73, CD90, CD105, CD271 und SSEA-4 [Vaculik, C. et al. 2011] zugesprochen wird. Die hier verwendeten FmSCs wurden nach ihrer Isolation aus der Hautgewebeprobe mittels FACS-Analyse speziell nach Zellen aussortiert, die gleichzeitig die Oberflächenantigene CD90 und CD271 besitzen. Bei in dieser durchgeführten FACS-Analyse sollte überprüft werden, inwieweit die Zellen nach der Kryokonservierung diese Oberflächenantigene weiterhin besitzen.

Die Ergebnisse dieser FACS-Analyse zeigten das Auftreten von den eigentlich 100 % CD90⁺/CD271⁺-Zellen lediglich 39,30 % der Zellen beide Oberflächenantigene aufzeigten. 60,4 % der Zellen hingegen besaßen nur CD90. Es wurde auch ein sehr geringer Anteil von 0,2 % CD271⁺-Zellen nachgewiesen, sowie 0,1 % an undefinierten Zellen. Diese können jedoch vernachlässigt werden und möglicherweise als Fehler des FACS-Gerätes oder der manuellen Kalibrierung zu Anfangs der FACS-Analyse betrachtet werden.

Insgesamt ist mit diesen Ergebnissen also ein Verlust an CD271 oder CD90⁺/CD271⁺ Zellen festzustellen. Dieser Verlust geht dabei möglicherweise mit dem Stress des Kryokonservierens einher. Möglicherweise aber auch durch das folgende

Passagieren zur Vorbereitung der FACS-Analyse (siehe 4.4 *Vorbereitung der FACS-Analyse*), wo die Zellen unter anderem dem Trypsin ausgesetzt werden. So zeigten Untersuchungen durch Chen, S. et al., dass durch eine Trypsin-vermittelte Ablösung von Makrophagen ihre zellspezifischen Oberflächenantigene CD14, CD163 und CD206 im Gegensatz zu anderen Abtrennungsmethoden verloren haben [Chen, S. et al. 2015]. Somit könnte auch hier das Verdauungsenzym Trypsin für den Verlust von CD271 verantwortlich sein. Letztendlich kann Trypsin auch für einen Verlust von CD90 verantwortlich sein. Allerdings ist CD90 für die Regulation der Adhärenz der Zellen verantwortlich [Saalbach, A. et al. 1998]. Sollten FmSCs also CD90 verlieren, können diese gleichzeitig nicht mehr in der Zellkultur überleben und verbleiben als tote Zellen in der flüssigen Phase des Mediums, die wiederum auch als tote Zellen durch das FACS identifiziert werden und somit während der Durchflusszytometrie nach CD90⁺ und CD271⁺ nicht beachtet werden.

Letztendlich konnten bei 99,7 % der Zellen CD90 nachgewiesen werden, wodurch stark vermuten lässt, dass CD90 für eine Lebensfähigkeit von FmSCs verantwortlich ist.

6.2 Einfluss der Trauma-Zytokine TNF α , IL-6 und EPO auf das Transkriptom mesenchymaler Stammzellen

6.2.1 RNA-Konzentration und Probenreinheit

Um das Transkriptom der Zellen zu untersuchen, wurde zu Anfang die RNA isoliert, mittels Spektralphotometrie die RNA-Konzentration und die Reinheit der Proben mit den Absorptionsverhältnissen 260/280 und 260/230 bestimmt.

Besonders auffällig bei dem Ergebnissen der RNA-Konzentrationen war, dass die ermittelte RNA-Konzentration des Kontrollansatzes KA gegenüber den anderen drei Ansätzen teilweise deutlich geringer war. So wird hier zu anfangs ein allgemeiner Einfluss der Zytokine auf die Menge an produzierter RNA dargestellt, sodass Zellen unter Einfluss von Zytokinen zunächst mehr RNA exprimieren als ohne derer.

Allerdings waren auch innerhalb der Proben der Zytokin-Ansätze deutliche Unterschiede in den Konzentration zu erkennen. Jeweils einer der Proben in den drei verschiedenen Ansätzen zeigte ein deutliches Defizit an exprimierter RNA-Menge gegenüber der anderen beiden Proben auf. Möglicherweise ist vor allem bei einer Probe von den Ansätzen TNF α und EPO während der RNA-Isolation RNA selbst verloren gegangen

oder es wurden von Anfang an weniger RNA durch die Zellen produziert. Da die Mengen an RNA in diesen Proben ähnlich der des Kontrollansatzes waren, kann man fast davon ausgehen, dass diese Zellen unter keinen Einfluss von Zytokinen kultiviert wurden, also unter denselben Bedingungen wie KA.

Die Proben der höheren RNA-Konzentration hingegen ähneln sich zwischen den drei Ansätzen TNF α , IL-6 und EPO, so dass hier kein signifikanter Unterschied des Einflusses der verschiedenen Zytokinzusammensätze auf die Menge exprimierter Zellen beschrieben werden kann.

Bei der Bestimmung der Probenreinheit zeigte sich zumindest bei der Untersuchung nach Proteinverunreinigung ein homogeneres Bild. Hier zeigten alle Proben aller vier Ansätze konstant einen Wert über den kritischen Wert von 2,0, wodurch grundsätzlich von einer reinen Probe frei von Proteinen gesprochen werden kann. Allerdings bietet dieser Referenzwert nicht die vollständige Garantie der Probenreinheit. Bei dem Indikator für die Verunreinigung durch organische Verbindungen sollten hingegen für eine Reinheit der Probe das Absorptionsverhältnis zwischen 2,0 und 2,2 liegen [URL-4]. So kann bei einigen Proben eine Verunreinigung durch organische Verbindungen festgestellt werden. Vor allem bei jeweils einer Probe des Kontrollansatzes KA und des Ansatzes EPO, die mit Werten unter 1 sogar weitaus niedriger als 2,0 liegen. Allgemein betrifft diese Art von Verunreinigung alle die Proben des Ansatzes EPO. Letztendlich werden diese Verunreinigungen aus der Durchführung der RNA-Isolation stammen, da in diesem Verfahren organische Verbindungen wie Ethanol oder β -Mercaptoethanol verwendet werden, die möglicherweise in den Waschschritten mit den entsprechenden Puffern nicht vollständig abzentrifugiert wurden. Grundsätzlich könnten solche Verunreinigungen die RNA-Seq stören und beeinflussen.

6.2.2 Differentielle Expressionsanalyse

Untersuchungen mit EPO in Verbindung mit Zytokinen wie IL-6, IL-1 β und TNF α haben gezeigt, dass diese Zusammensetzung an Zytokinen das Zellwachstum von FmSCs verstärkt und gleichzeitig die Regeneration der Haut fördert [Bader, a. et al. 2011]. Im Gegensatz dazu konnte festgestellt werden, dass die Zytokine IL-6 und TNF α in Patienten mit diagnostizierten Hautkrebs in erhöhter Konzentration auftreten und jeweils abhängig ihrer Mikroumgebung krebshemmend, aber auch krebsfördernd wirken können [Ghahartars, M. et al. 2020]. Im Laufe dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen

Effekt die Zusammensetzung der Zytokine TNF α , IL-6 und EPO in verschiedenen Kombinationen auf das Transkriptom und speziell auf die Expression krebsassoziierter Gene haben bzw. ob EPO möglicherweise eine Verringerung solcher Gene hervorruft und somit einen positiven Effekt auf das Transkriptom unter Einfluss der anderen beiden Zytokine hat.

Insgesamt zeigten die differentiellen Expressionsanalysen (DE) der Ansätze TNF α , IL-6 und EPO gegenüber dem Kontrollansatz KA jeweils eine verstärkter Expression von mehr als doppelt so vielen Genen als im Kontrollansatz. Letztendlich zeigen die durch TNF α , IL-6 und EPO vermindert exprimierten Gene auch eine signifikant verstärkte Genexpression in KA. Bei allen drei Ansätzen wurden rund 700 verschiedene Gene mehr als im Kontrollansatz verstärkt exprimiert. Die Erhöhung der Expression von RNA konnte dabei gleichzeitig bei den bestimmten RNA-Konzentration der verschiedenen Proben (siehe 5.2.1 *Bestimmung der RNA-Konzentration*) festgestellt werden. Das wiederum deutet daraufhin, dass die Zytokine in den Zellen dafür sorgen, dass vermehrt Gene exprimiert werden. Allerdings erhöht sich die Menge nicht mit steigenden Zusatz der Zytokintypen selbst, da zwischen den verschiedenen Ansätzen selbst aber keine signifikanten Unterschiede in der Menge an verstärkt exprimierten Genen festgestellt werden konnte.

Bemerkenswert jedoch ist, dass sich um knapp ein Viertel aller identifizierten Gene um krebsassoziierte Gene handelt, wobei auch hier kaum Unterschiede zwischen den Ansätzen erkennbar sind. Da es sich allerdings hier nur um die Gesamtheit krebsassoziierter Gene handelt, unabhängig, ob sie in den Ansätzen mit den Zytokinen signifikant vermehrt oder signifikant verringert exprimiert wurden, gibt dies noch keine Aussage, inwieweit die Art des Zytokins Einfluss auf die Expression krebsassoziierter Gene hat.

Dazu wurde innerhalb der krebsassozierten Gene zwischen signifikant erhöhter und signifikant verringerter Expression unterschieden und bei allen drei Ansätzen konnte festgestellt werden, dass die Zellen unter Einfluss der Zytokine auch die Expression krebsassoziierter Gene gegenüber des Kontrollansatzes verstärkt haben. Vor allem bei der Zugabe von TNF α und der Kombination aus TNF α , IL-6 und EPO ist der Unterschied zwischen der Anzahl an krebsassozierten Genen, die durch die Zellen unter Einfluss der Zytokine verstärkt exprimiert wurden und krebsassozierten Genen, die im Kontrollansatz

eher weniger exprimiert wurden, recht groß. Somit sorgt beispielsweise schon TNF α alleine für ein erhöhtes Risiko der Tumorbildung. Mit der Zugabe von IL-6 in Verbindung mit TNF α hingegen ist die Anzahl der verstärkt exprimierten, krebsassoziierten Gene sogar leicht zurückgegangen, während bei den Zellen mit zusätzlichen EPO die höchste Anzahl solcher Gene nachgewiesen wurde. Somit weist EPO hier keine hemmende Wirkung gegenüber der Expression krebsassoziiierter Gene und in Verbindung mit der hohen Anzahl an krebsassoziierten Genen bleibt das Risiko einer Tumorbildung erhalten.

Gleichzeitig zeigte ein Identitätsvergleich der krebsassoziierten, verstärkt exprimierten Gene eine erhöhte Ähnlichkeit der Zellkulturen mit TNF α und TNF α , IL-6 und EPO auf. Bei den Zellen, die unter Einfluss der Zytokine TNF α und IL-6 standen, konnten die größte Anzahl an Genen identifiziert werden, die weder bei den Zellen mit TNF α noch bei Zellen mit allen drei Zytokinen signifikant mehr exprimiert wurden. Das lässt darauf rückschließen, dass sich das Transkriptom mit dem Zusatz von IL-6 und TNF α im Gegensatz zum Transkriptom unter Einfluss von TNF α stärker verändert wurde. Wenn wiederum EPO in Verbindung mit den beiden Zytokinen den Zellen hinzugegeben werden, scheinen diese ein ähnliches Transkriptom zu produzieren, wie Zellen, die nur unter Einfluss von TNF α stehen. Auch die Ähnlichkeit der Anzahl stärker exprimierter, krebsassoziierten Gene zwischen den Ansätzen TNF α und EPO deutet daraufhin, dass das Transkriptom mit allen drei Zytokinen einen ähnlichen Zustand erreicht wie ein Transkriptom ohne IL-6 und EPO. Somit scheint EPO zwar die Expression von krebsassoziierten Genen nicht zu verringern. Es scheint aber die Wirkung von IL-6 auf das Transkriptom teils auszuhebeln.

In den Genen, die bei durch die verschiedenen Ansätze am häufigsten exprimiert wurden, stimmen diese jedoch größtenteils überein, wobei zu diesen 15 Genen 13 Gene in die Gruppe der krebsassoziierten Gene gehören. So wurden als Reaktion auf die Zytokine unter anderem das Gen CYP7B1 für das Enzym der Cytochrom P450-Superfamilie, das Gen C3 und die Gene CXCL1/5/8/10/11 für die Motif Chemokine 1/5/8/10/11 durch teilweise alle drei Ansätze in der höchsten Menge exprimiert.

Bei diesem Mitglied der Cytochrom P450-Superfamilie handelt es sich um ein Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums, das den Cholesterinabbau in extrahepatischem Gewebe katalysiert [URL-5]. Dazu wird es hauptsächlich in der Leber

exprimiert. Gleichzeitig sind die höchsten Werte an dessen mRNA beim Menschen in Nieren und Gehirn zu finden. [Stiles, A. R. et al. 2009]. Somit sorgen die Zytokine dafür, dass in den FmSCs, die eigentlich der Haut entnommen wurden, ein Enzym produziert werden kann, welches hauptsächlich in Hepatozyten vorkommt und für eine charakteristische Funktion hepatischen Gewebes mitverantwortlich ist. Letztendlich sind die hier verwendeten Zellen Vorreiterzellen des Mesenchyms, zu dem die Leber und Nieren gehören, wodurch sie die Tendenz aufzeigen könnten, neben Hautstammzellen auch Zellen dieser Organe auszubilden. Eine Studie von Shi, S.-Z. et al. zeigt außerdem, dass eine Hypermethylierung von CYP7B1 eine Anhäufung von 27-Hydroxycholesterin (27-HC) bei Brustkrebs verursacht, wobei das 27-HC den Brustkrebs fördert [Shi, S.-Z. et al. 2019].

Weiterhin rufen die Zytokine $TNF\alpha$, IL-6 und EPO auch eine erhöhte Expression von CXC motif Chemokinen, Chemokine gehören selbst zu den Zytokinen und sind für das Migrationsverhalten von an der Immunreaktion beteiligter Zellen verantwortlich [Resch, K. et al. 2010]. So reagieren hier die FmSCs auf die zugesetzten Trauma-Zytokine schlussendlich wie bei einer Immunreaktion, hervorgerufen beispielsweise durch eine Schnittwunde der Haut. So simulieren hier die Trauma-Zytokine eine Immunreaktion, wodurch die Zellen angeregt sind, diese fortzuführen. Die hohe Expression ist dabei auch darauf allgemein zurückzuführen, dass Chemokine im allgemeinen durch Entzündungsreize (welche hier der Einfluss der Zytokine entspricht) hochreguliert werden [Resch, K. et al. 2010].

Ebenfalls das Ergebnis dieser simulierten Immunreaktion der FmSCs ist die hohe Expression des Komplementmoleküls C3, dass bei der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt ist [URL-6] oder auch von IL-4 I1, ein L-Aminosäure-Oxidase-Protein, welches eigentlich durch Interleukin-4 in B-Zellen induziert wird [URL-7]. Somit wird schlussendlich hier in Verbindung der unspezifischen Expression Haut-untypischer auch das noch hohe Differenzierungspotenzial dieser Zellen aufgezeigt. Letztendlich hat EPO auch hier keinen Einfluss auf die Expression dieser Gene, da die Stärke der Expression durch die Zellen mit EPO keine signifikanten anderen Werte aufzeigt, wie die der anderen beiden Ansätze.

Insgesamt verstärkten die Zytokine unabhängig ihrer Zusammensetzung deutlich die Expression neuer Gene, wobei ein großer Anteil der Gene bei der Entstehung von Krebs

beteiligt sein kann. Allerdings sind bei den Zellen unter Einfluss von TNF α und den Zellen mit TNF α , IL-6 und EPO die meisten identischen signifikant mehr exprimierten und krebsassoziierten Genen identifiziert wurden, während die Gene von den Zellen mit TNF α und IL-6 sich eher von den beiden anderen Zellkulturen unterscheiden. So lässt sich vermuten, dass EPO die Induktion der durch IL-6 induzierten Gene hemmt. Gleichzeitig kann aber insgesamt keine Verringerung solcher Gene durch EPO beobachtet werden und es keinen Einfluss auf die durch TNF α induzierte Genexpression zu scheinen hat. Letztendlich unterscheiden sich die am stärksten exprimierten Gene zwischen den verschiedenen Ansätzen nur in sehr geringer Menge, da es sich dabei hauptsächlich um Gene für an der Immunreaktion beteiligten Moleküle handelt, die durch TNF α als auch IL-6 simuliert wird. Auch hier schein EPO keine signifikante Veränderung des Transkriptoms hervorzurufen.

7 Ausblick

Ausblickend wird empfohlen, weitere Zellkulturen unter Einfluss dieser Zytokine zu kultivieren, ihr Transkriptom zu sequenzieren und anschließend eine differentielle Expressionsanalyse durchzuführen, um Referenzdaten zu erzeugen. So sollten dabei auch andere Kombinationen der drei Zytokine eingesetzt werden bzw. sollten möglicherweise auch die Konzentrationen dieser verändert werden. So besteht vielleicht die Möglichkeit, dass EPO einen positiveren Einfluss auf das Transkriptom der Zellen hat, wenn seine Konzentration weiter erhöht wird.

Letztendlich wurde hier die differentiellen Expressionsanalysen nur zwischen den Transkriptomen unter Einfluss der Zytokinen und den Kontrollansatz durchgeführt. So könnte zur Erweiterung der Untersuchung eine DE zwischen den Transkriptomen der Ansätze TNF α , IL-6 und EPO selbst durchgeführt werden, um zu prüfen, welche Gene unter Einfluss des einen oder anderen Zytokins stärker oder verminderter exprimiert werden.

Weiterhin lässt sich aufgrund der Ergebnisse teilweise vermuten, dass EPO zwar keinen Einfluss auf die Wirkung von TNF α , aber möglicherweise die von IL-6 hat. Dazu sollte die Veränderung des Transkriptoms durch IL-6 gegenüber TNF α noch genauer untersucht werden. Gleichzeitig sollte das Transkriptom unter Einfluss nur von TNF α mit dem Transkriptom unter Einfluss von TNF α und EPO verglichen werden, um zu bestätigen, dass EPO keinen Einfluss auf die Wirkung von TNF α hat.

Sollten schlussendlich weitere Zellkulturen verwendet werden, sollte man auch auf die Herkunft der Zellen eingehen. So könnte Alter oder ein krankheitsbedingter Hintergrund der Person, von dem die verwendeten Zellen stammen, auch Einfluss auf die Wirkung der Zytokine auf die Zellen haben.

8 Zusammenfassung

Das Transkriptom der Zellen ist ein dynamischer Zustand, der als Gesamtheit der RNA zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle vorzufinden ist. Das Transkriptom verändert sich abhängig vom Differenzierungszustand, Art der Zelle oder äußere Einflüsse, die auf die Zelle einwirken. So können auch Zytokine durch Bindung an entsprechende Zellrezeptoren dieses Transkriptom beeinflussen.

Mithilfe der verschiedenen Trauma-Zytokine TNF α , IL-6 und EPO wurde im Laufe dieser Arbeit deren Einfluss auf das Transkriptom mesenchymaler Hautstammzellen, den sogenannten mesenchymalen stammzellähnlichen Fibroblasten, untersucht. Dabei hat man sich auf die Expression krebsassoziiertes Gene konzentriert und versucht zu ergründen, ob EPO möglicherweise eine Verminderung solcher Gene hervorruft.

Dazu wurden vier verschiedene Zellkulturansätze mit verschiedener Zytokinzusammensetzung erstellt. Als KA funktionierte eine Zellkultur, die unter den allgemeinen Bedingungen der Kultivierung von mesenchymalen Zellen ohne Zytokinzusatz kultiviert. Einem anderen Ansatz wurde das Zytokin TNF α hinzugegeben und dem dritten wiederum erhielt neben TNF α , das Zytokin IL-6. Schlussendlich wurde neben diesen beiden Zytokinen auch EPO hinzugefügt.

Da es sich außerdem bei den Zellen um 100%ige CD90⁺/CD271⁺ Zellen handelte, hatte man zusätzlich einer Charakterisierung dieser Zellen mittels FACS-Analyse durchgeführt. Diese zeigte dazu einen signifikanten Verlust des Oberflächenantigens CD271 auf, der möglicherweise aufgrund des Stresses während der Kryokonservierung unter DMSO und dem Einwirken des Enzyms Trypsin hervorgerufen wurde.

Nach einwöchiger Kultivierung der Zellen mit und ohne Zytokine wurde ihr RNA isoliert sowie deren Konzentration und Reinheit bestimmt. Die RNA-Konzentrationen der Ansätze mit Zytokinen zeigten eine deutliche erhöhte Menge an RNA im Gegensatz zum Kontrollansatz auf. Aufgrund dessen konnte schon zu Anfang eine verstärkte Genexpression unter Einfluss der Zytokine festgestellt werden. Bei der Bestimmung der Reinheit der Proben, war eine einheitliche Reinheit aller Proben gegenüber Proteinen festgestellt wurden. Während eine Verunreinigung durch organische Verbindungen bei

einigen Proben bestand, die während der RNA-Isolation nicht vollständig entfernt wurden.

Letztendlich wurde mit der isolierten RNA eine RNA-Sequenzierung durchgeführt, die der Sequenzierung des Transkriptoms entspricht. Anschließend wurde mit dem ermittelten Transkriptom der Zellen eine differentielle Expressionsanalysen zwischen den Ansätzen mit den Zytokinen und dem Kontrollansatz.

Die DE bestätigte dazu, dass die Zellen unter Einfluss der Zytokine bestimmte Gene vermehrt exprimierten. Außerdem konnte ein Viertel der Gene mithilfe des DAVID-Tools als krebsassoziierte Gene identifiziert werden. Bei der Unterscheidung zwischen signifikant vermehrter und signifikant verringerter Expression dieser Gene, wurde außerdem festgestellt, dass vermehrt unter Einfluss der Zytokine exprimiert wurden, wobei der Ansatz mit TNF α und IL-6 eine verringerte Anzahl im Gegensatz zu den anderen Genen aufzeigt. Im Hinblick auf eine mögliche Verminderung von krebsassoziierten Zellen durch EPO konnte keine Verringerung krebsassoziierten Gene festgestellt werden.

Gleichzeitig zeigte ein Vergleich der Gene zwischen den Ansätzen, dass zwar ein Großteil gleicher, krebsassoziierten Gene in allen drei Ansätzen identifiziert wurden, aber die meisten identischen Gene zwischen dem Ansatz mit TNF α und dem Ansatz mit TNF α , IL-6 und EPO zu finden waren. Somit lässt dies die Vermutung offen, dass EPO die Wirkung von IL-6 fast aushebelt und die Zellen ein Transkriptom ausbilden, welches dem Transkriptom der Zellen, die nur unter Einfluss von TNF α stehen, stark ähnelt.

Beim Vergleich der Gene, die in allen drei Ansätzen am signifikant häufigsten exprimiert wurden, konnte ein homogeneres Gesamtbild festgestellt werden. So gehörte unter anderem das Cytochrom P450 – Gen CYP7B1 dazu. Da es sich bei diesem Gen um ein eher Hepatozyten-spezifisches Gen handelt, welches auch in Niere und Leber in hoher Konzentration auftritt [Stiles, A. R. et al. 2009], sorgen hier die Zytokine für eine minimale Differenzierungstendenz der veränderten Hautstammzellen zu dieser Art von Zellen.

Schlussendlich simulieren die Zytokine zusätzlich eine Immunreaktion, wodurch vor allem Gene für CXC-Chemokine verstärkt exprimiert wurden, die selbst als Zytokine bei einer Immunreaktion das Migrationsverhalten von Immunzellen verwalten [Resch, K. et al. 2010]. Ebenfalls als Reaktion auf eine Immunreaktion zeigte auch das Gen für das

Komplementmoleküls C3, dass das Komplementsystem aktiviert [URL-6] und das Gen IL-4 I1 für das L-Aminosäure-Oxidase-Protein, was eigentlich durch Interleukin-4 in B-Zellen induziert wird [URL-7]. Somit wird hier in Verbindung der unspezifischen Expression Haut-untypischer Gene auch der geringe Differenzierungsgrad der verwendeten dermalen FmSCs aufgezeigt.

9 Summary

The transcriptome of cells is a dynamic state that is the totality of RNA found in the cell at a given time. The transcriptome changes depending on the state of differentiation, the type of cell or external influences acting on the cell. Thus, cytokines can also influence this transcriptome by binding to corresponding cell receptors.

Using the different trauma cytokines TNF α , IL-6 and EPO, their influence on the transcriptome of mesenchymal skin stem cells, the so-called mesenchymal stem cell-like fibroblasts, was investigated in the course of this work. The focus has been on the expression of cancer-associated genes and an attempt has been made to determine whether EPO possibly causes a reduction in such genes.

For this purpose, four different cell culture approaches with different cytokine additions were created. One cell culture worked as KA, culturing under the general conditions of culturing mesenchymal cells without cytokine addition. The cytokine TNF α was added to another approach and the cytokine IL-6 was added to the third approach in addition to TNF α . Finally, EPO was added in addition to these two cytokines.

Furthermore, since the cells were 100% CD90+/CD271+ cells, an additional characterization of these cells was performed by FACS analysis. This finally revealed a significant loss of the surface antigen CD271, which was possibly caused by the stress during cryopreservation under DMSO and the action of the enzyme trypsin.

After one week of cultivation of the cells with and without the cytokines, their RNA was isolated, and its concentration and purity determined. The RNA concentrations of the approaches with cytokines showed a significantly increased amount of RNA in contrast to the control approach. Due to this, an increased gene expression under the influence of the cytokines could be detected already at the beginning. When determining the purity of the samples, a uniform purity of all samples with respect to proteins was found. While there was contamination by organic compounds in some samples, which were not completely removed during RNA isolation.

Finally, RNA sequencing was performed with the isolated RNA, corresponding to the sequencing of the transcriptome. Subsequently, using the determined transcriptome of the

cells, a differential expression analysis was performed between the approaches with the cytokines and the control approach.

To this end, DE confirmed that the cells increased expression of certain genes under the influence of the cytokines. In addition, a quarter of the genes could be identified as cancer-associated genes using the DAVID tool. When distinguishing between significantly increased and significantly decreased expression of these genes, it was also found that increased were expressed under the influence of cytokines, with the approach using TNF α and IL-6 showing a decreased number in contrast to the other genes. With regard to a possible reduction of cancer-associated cells by EPO, no reduction of cancer-associated genes was detected.

At the same time, a comparison of the genes between the approaches showed that although a large proportion of the same cancer-associated genes were identified in all three approaches, most of the identical genes were found between the approach with TNF α and the approach with TNF α , IL-6, and EPO. Thus, this leaves open the suggestion that EPO almost cancels out the effect of IL-6 and that the cells form a transcriptome that closely matches the transcriptome of cells under the influence of TNF α alone.

When comparing the genes that were expressed most significantly in all three approaches, a more homogeneous overall picture was observed. The cytochrome P450 gene CYP7B1 was one of them. Since this gene is hepatocyte-specific and also occurs in high concentrations in kidney and liver [Stiles, A. R. et al. 2009] the cytokines here provide a minimal differentiation tendency of the altered skin stem cells to this type of cells.

Finally, the cytokines additionally simulate an immune response, whereby especially genes for CXC chemokines were increased, expressed, which themselves manage the migration behavior of immune cells as cytokines in an immune response [Resch, K. et al. 2010]. Also, in response to an immune response, the gene for complement molecule C3 also showed that activates the complement system [URL-6] and the gene IL-4 I1 for L-amino acid oxidase protein, which is actually induced by interleukin-4 in B cells [URL-7]. Thus, finally, in connection with the non-specific expression of skin-untypical also the still high differentiation potential of these cells is shown here.

Literaturverzeichnis

- Bader, a. et al.** (2011). *Interactive role of trauma cytokines and erythropoietin and their therapeutic potential for acute and chronic wounds*. Rejuvenation research. Heftnummer: 01. S. 57–66.
- Bahlmann, F. H. et al.** (2004). *Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells*. Blood. Heftnummer: 03. S. 921–926.
- Baumann, S. & Jochum, W.** (2018). *Hochdurchsatz-Sequenzierung in der molekularen Tumordiagnostik*. Schweizer Zeitschrift für Onkologie. S. 4; 6-10.
- Bienvenu, A.-L. et al.** (2008). *Artesunate-erythropoietin combination for murine cerebral malaria treatment*. Acta tropica. Heftnummer: 02. S. 104–108.
- Blumenberg, M.** (2019). *Transcriptome Analysis*. IntechOpen.
- Bodó, E. et al.** (2007). *Human hair follicles are an extrarenal source and a nonhematopoietic target of erythropoietin*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. Heftnummer: 12. S. 3346–3354.
- Bunn, H. F.** (2013). *Erythropoietin*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. Heftnummer: 03.
- Cerroni, L. et al.** (2016). *Histopathologie der Haut*. 2. Auflage: Springer.
- Cheetham, J. C. et al.** (1998). *NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation*. Nature structural biology. Heftnummer: 10. S. 861–866.
- Chen, F. G. et al.** (2007). *Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis*. Journal of cell science. Heftnummer: 16. S. 2875–2883.
- Chen, S. et al.** (2015). *Impact of Detachment Methods on M2 Macrophage Phenotype and Function*. Journal of immunological methods. Heftnummer: . S. 56–61.

URL-9 [Aufgerufen am: 04.09.2022] **DAZ.online**. *Die Haut – unser größtes Organ*.

URL: <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2011/daz-12-2011/die-haut-unser-groesstes-organ>.

Degano, M. & Garau, G. (2019). *Crystal structure of human NGR-TNF*.

URL-3 [Aufgerufen am: 22.06.2022] **Deutscher Ärzteverlag GmbH, Redaktion**

Deutsches Ärzteblatt. *Doping: Erythropoetin – Medikament und Dopingmittel*. URL: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/80056/Doping-Erythropoetin-Medikament-und-Dopingmittel>.

URL-2 [Aufgerufen am: 20.06.2022] **DocCheck Medical Services GmbH**. *Zytokin -*

DocCheck Flexikon. URL: <https://flexikon.doccheck.com/de/Cytokin>.

Fuchs, J. M. (14. Februar 2016). *Stammzellen in der Wundheilung*. Graz, Medizinische Universität Graz, Klinische Abteilung für Plastische, Ästhetische und Rekonstruktive Chirurgie, Diplomarbeit.

Ghahartars, M. et al. (2020). *Investigation of TNF- α and IL-6 Levels in the Sera of Non-Melanoma Skin Cancer Patients*. Iranian Biomedical Journal. Heftnummer: 02. S. 88–92.

Greten, F. R. & Grivennikov, S. I. (2019). *Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms and Consequences*. Immunity. Heftnummer: 01. S. 27–41.

Idriss, H. T. & Naismith, J. H. (2000). *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microscopy research and technique. Heftnummer: 03. S. 184–195.

Jelkmann, W. et al. (2008). *The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues*. Critical reviews in oncology/hematology. Heftnummer: 01. S. 39–61.

Jelkmann, W. & Metzen, E. (1996). *Erythropoietin in the control of red cell production*. Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft. Heftnummer: 05. S. 391–403.

URL-4 [Aufgerufen am: 29.08.2022] **Jones, A.** *TN 130 Purity Ratios Explained*. URL: <https://www.denovix.com/tn-130-purity-ratios-explained/>.

Krantz, S. B. (1991). *Erythropoietin*. Blood. Heftnummer: 03. S. 419–434.

Kühl, S. & Kühl, M. (2012). *Stammzellbiologie*. Erste Auflage: Ulmer. S. 9 -12, 14, 57, 60 - 62, 94 - 97, 99, 100.

Kumar, A. et al. (2016). *Multiple roles of CD90 in cancer*. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Heftnummer: 09. S. 11611–11622.

URL-6 [Aufgerufen am: 31.08.2022] **NCBI**. *C3 Komplement C3 [Homo sapiens (Mensch)]*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/718>.

URL-5 [Aufgerufen am: 31.08.2022] **NCBI**. *CYP7B1 Cytochrom P450 Familie 7 Unterfamilie B Mitglied 1 [Homo sapiens (Mensch)]*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9420#gene-expression>.

URL-7 [Aufgerufen am: 31.08.2022] **NCBI**. *IL4I1 Interleukin 4 induced 1 [Homo sapiens (Mensch)]*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/259307>.

Resch, K. et al. (2010). *Immunpharmakologie*. 1. Aufl.: Ulmer. S. 109 - 140.

Robinson, M. D. & Oshlack, A. (2010). *A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data*. Genome biology. Heftnummer: 03. S. R25.

Rosanski, M. (08. Februar 2012). *Diagnostik von humanen mesenchymalen Stammzellen der Haut unter dem Einfluss von Erythropoietin*. Lausitz, Hochschule Lausitz University of Applied Sciences, Praxisarbeit.

Saalbach, A. et al. (1998). *The monoclonal antibody AS02 recognizes a protein on human fibroblasts being highly homologous to Thy-1*. Archives of dermatological research. Heftnummer: 07. S. 360–366.

Sack, U. (2016). Anderer, Ursula, et al. *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. De Gruyter Inc. S. 291 - 341.

Shapiro, H. M. (2003). *Practical flow cytometry*. 4. Auflage: Wiley-LISS.

Shi, S.-Z. et al. (2019). *Recruitment of monocytes and epigenetic silencing of intratumoral CYP7B1 primarily contribute to the accumulation of 27-hydroxycholesterol in breast cancer*. American journal of cancer research. Heftnummer: 10. S. 2194–2208.

- Somers, W. S. et al.** (1998). *HUMAN INTERLEUKIN-6*.
- URL-8 [Aufgerufen am: 01.09.2022] **Spektrum.de**. *zentrales Dogma der Molekularbiologie*. URL: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/zentrales-dogma-der-molekularbiologie/13061>.
- Stiles, A. R. et al.** (2009). *CYP7B1: One Cytochrome P450, Two Human Genetic Diseases, and Multiple Physiological Functions**. The Journal of Biological Chemistry. Heftnummer: 42. S. 28485–28489.
- Tam, K. et al.** (2014). *A nanoscaffold impregnated with human wharton's jelly stem cells or its secretions improves healing of wounds*. Journal of cellular biochemistry. Heftnummer: 04. S. 794–803.
- Tan, C. C. et al.** (1992). *Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia*. The American journal of physiology. Heftnummer: 03 Pt 02. S. F474-81.
- Tanaka, T. et al.** (2018). *Interleukin (IL-6) Immunotherapy*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Heftnummer: 08.
- Vaculik, C. et al.** (2011). *Human Dermis Harbors Distinct Mesenchymal Stromal Cell Subsets*. The Journal of Investigative Dermatology. Heftnummer: 03. S. 563–574.
- Wagner, W. et al.** (2005). *Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood*. Experimental hematology. Heftnummer: 11. S. 1402–1416.
- Wang, Z. et al.** (2009). *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nature reviews. Genetics. Heftnummer: 01. S. 57–63.
- Watanabe, D. et al.** (2005). *Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy*. The New England journal of medicine. Heftnummer: 08. S. 782–792.
- Zouboulis, C.** (2009). *Stammzellen und ihre Bedeutung in der Dermatologie*. Aktuelle Dermatologie. Heftnummer: 04. S. 120–128.

URL-1 [Aufgerufen am: 15.02.2022] **Zwick, Y.** *Die Haut: Aufbau, Funktion und Krankheiten*. URL:

<https://www.springerpflege.de/hautpflege/hauterkrankungen/haut-aufbau-funktion-und-krankheiten/15089698>.

Anhang**Anhang A – RNeasy® Plus Mini Kit von Qiagen**

2. Disrupt the cells by adding Buffer RLT Plus.

For pelleted cells, loosen the cell pellet thoroughly by flicking the tube. Add the appropriate volume of Buffer RLT Plus (see Table 4). Vortex or pipet to mix, and proceed to step 3.

Note: Incomplete loosening of the cell pellet may lead to inefficient lysis and reduced RNA yields. Ensure that β -ME is added to Buffer RLT Plus before use (see “Important points before starting”).

Table 4. Volumes of Buffer RLT Plus for lysing pelleted cells

Number of pelleted cells	Volume of Buffer RLT Plus
$<5 \times 10^6$	350 μ l
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600 μ l

3. Homogenize the lysate according to step 3a, 3b or 3c.

See “Disrupting and homogenizing starting material” page 13, for more details on homogenization. If processing $\leq 1 \times 10^5$ cells, they can be homogenized by vortexing for 1 min. After homogenization, proceed to step 4.

Note: Incomplete homogenization leads to significantly reduced RNA yields and can cause clogging of the Rneasy spin column. Homogenization with a rotor–stator or QIAshredder homogenizer generally results in higher RNA yields than with a syringe and needle.

- 3a. Pipet the lysate directly into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at maximum speed. Proceed to step 4.
- 3b. Homogenize the lysate for 30 s using the TissueRuptor II. Proceed to step 4.
- 3c. Pass the lysate at least 5 times through a 20-gauge needle (0.9 mm diameter) fitted to an Rnase-free syringe. Proceed to step 4.

4. Transfer the homogenized lysate to a gDNA Eliminator spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge for 30 s at $\geq 8\,000 \times g$ ($\geq 10\,000\text{ rpm}$). Discard the column, and save the flow-through.

Note: Make sure that no liquid remains on the column membrane after centrifugation. If necessary, repeat the centrifugation until all liquid has passed through the membrane.

5. Add 1 volume (usually 350 μl or 600 μl) of 70% ethanol to the flow-through, and mix well by pipetting. Do not centrifuge. If some lysate was lost during homogenization and DNA removal, adjust the volume of ethanol accordingly.

Note: When purifying RNA from certain cell lines, precipitates may be visible after addition of ethanol. This does not affect the procedure.

6. Transfer up to 700 μl of the sample, including any precipitate that may have formed, to an Rneasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8\,000 \times g$ ($\geq 10\,000\text{ rpm}$). Discard the flow-through.*

Reuse the collection tube in step 7.

If the sample volume exceeds 700 μl , centrifuge successive aliquots in the same Rneasy spin column. Discard the flow-through after each centrifugation.

7. Add 700 μl Buffer RW1 to the Rneasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8\,000 \times g$ ($\geq 10\,000\text{ rpm}$) to wash the spin column membrane. Discard the flowthrough.

Reuse the collection tube in step 8.

Note: After centrifugation, carefully remove the Rneasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

8. Add 500 μl Buffer RPE to the Rneasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8\,000 \times g$ ($\geq 10\,000\text{ rpm}$) to wash the spin column membrane. Discard the flowthrough.

Reuse the collection tube in step 9.

Note: Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see “Important points before starting”).

9. Add 500 μl Buffer RPE to the Rneasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at $\geq 8\,000 \times g$ ($\geq 10\,000\text{ rpm}$) to wash the spin column membrane. The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

Note: After centrifugation, carefully remove the Rneasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

10. **Optional:** Place the Rneasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Centrifuge at full speed for 1 min. Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the Rneasy spin column after step 9.

11. Place the Rneasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 μl Rnase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at $\geq 8\,000 \times g$ ($\geq 10\,000\text{ rpm}$) to elute the RNA.

12. If the expected RNA yield is $>30\ \mu\text{g}$, repeat step 11 using another 30–50 μl of Rnase-free water, or using the eluate from step 11 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 11. 0.

If using the eluate from step 11, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of Rnase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

Anhang B – Ergebnisse Spektralphotometrie Nano-Drop

Tabelle 3: Ergebnisse der Spektralphotometrie der FmSCs

Ansatz	RNA-Probe*	RNA-Konzentration [ng/µl]	260/280	260/230
Kontrollansatz (KA)	1a	594,31	2,05	2,18
	1b	355,26	2,08	1,73
	1c	178,12	2,03	0,98
TNF α	2a	1009,84	2,05	2,20
	2b	414,68	2,05	2,13
	2c	1265,85	2,07	2,08
TNF α & IL-6	3a	1095,64	2,08	1,99
	3b	748,63	2,08	2,08
	3c	1209,49	2,06	2,01
TNF α , IL-6 & EPO	4a	319,61	2,06	0,84
	4b	1143,93	2,07	1,94
	4c	922,04	2,06	1,87

Anhang C – Ergebnisse der Durchflusszytometrie

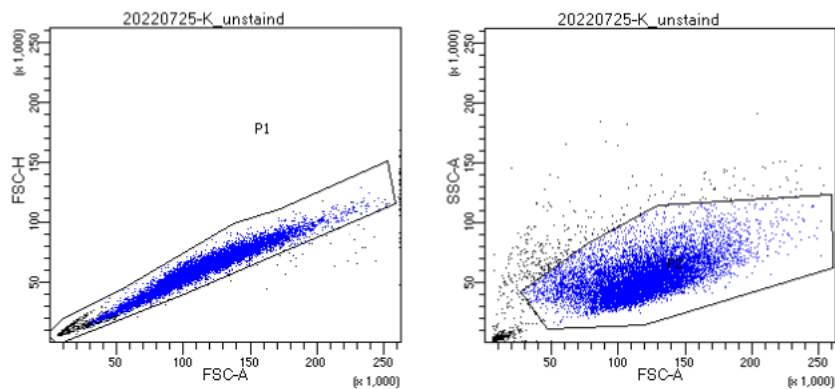


Abbildung 16: Dotplot zur Kallibrierung des FACS-Gerätes

C.1 Negativ-Kontrolle

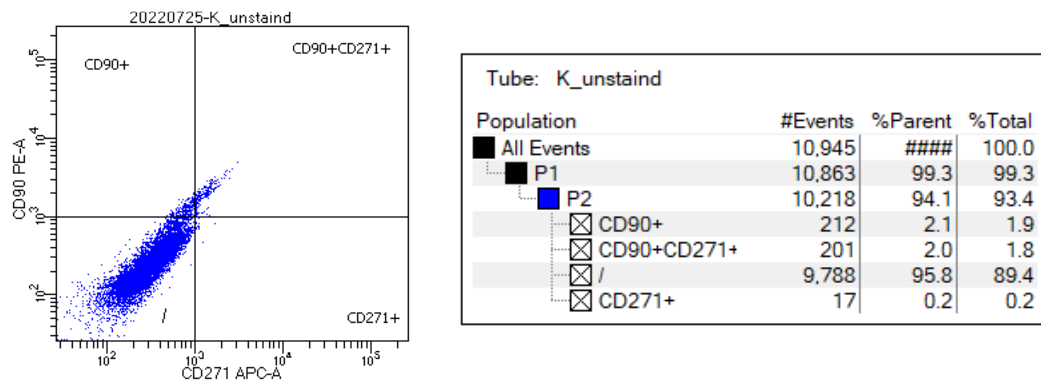


Abbildung 17: Dotplot und Quantifizierung unmarkierter Zellen

C.2 CD271⁺

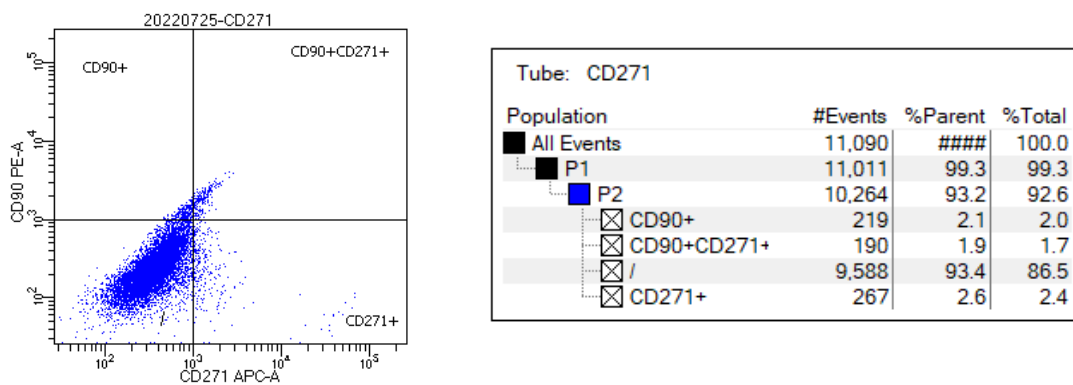


Abbildung 18: Dotplot und Quantifizierung CD271⁺-markierter Zellen

C.3 CD90⁺

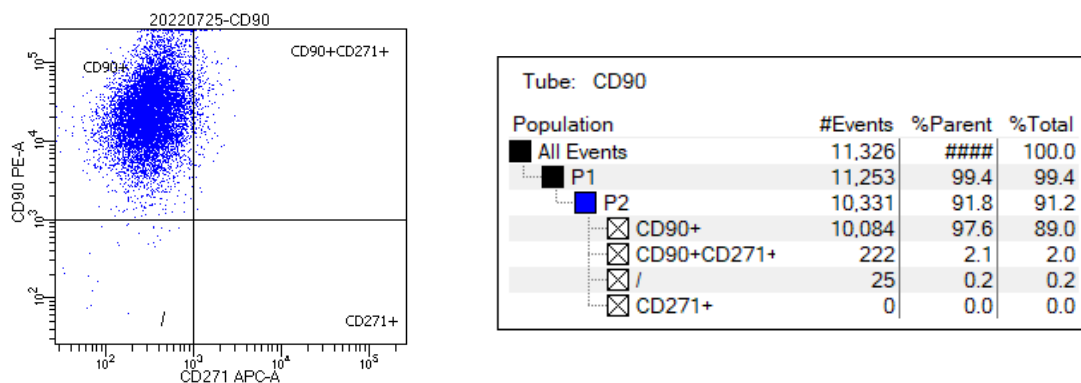


Abbildung 19: Dotplot und Quantifizierung CD90⁺-markierter Zellen

C.4 UKL001-P1

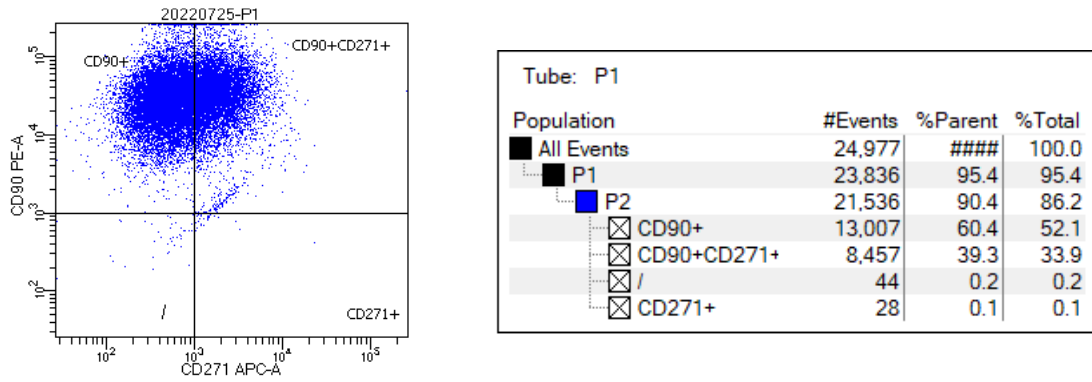


Abbildung 20: Dotplot und Quantifizierung der verwendeten FmSCs

Anhang D – Ergebnisse differentieller Expressionsanalyse

Tabelle 4: Koeffizienten der contrast-Matrix und die dazugehörigen Gene

	TNFα	IL-6	EPO
Gen	Coef. gT - gC	Coef. gI - gC	Coef. gE - gC
C3*	10,3834253	10,31578414	9,97069029
CCL5*	6,6439691	7,751745357	6,93467335
CMPK2*	8,64854228	9,235488963	8,88513624
CXCL1*	9,29058916	8,815990963	7,70312925
CXCL10*	8,57616537	9,811655939	9,55924243
CXCL3*	6,99661553	6,39455669	5,85336434
CXCL11*	-	8,08605294	7,65491414
CXCL5*	9,40106655	9,77456578	9,89477377
CXCL6*	7,12651559	7,492876351	7,18883123
CXCL8*	10,5715214	10,69363922	11,2035341
CYP7B1*	11,5326753	12,00899576	11,0462277
IFI44L	6,84290721	7,368623776	6,95972093
IL1B*	5,95912758	6,631900895	7,4640233
IL32	6,84484958	6,899293955	6,47835228
IL4I1*	8,39911056	8,515474283	8,43867421
MEOX1*	8,19737642	8,817646077	7,99781228
MMP9*	7,41692257	7,913669661	7,32895811
MX1*	7,03659162	7,249748791	7,27045038
OASL*	7,33808524	7,910575109	7,44611578
PEDS1-UBE2V1	7,9919179	-	-
RSAD2*	7,30711906	8,890468733	8,40206864
SERPINB2*	6,63356104	6,988265017	7,97073897
SLAMF8	7,17986642	7,541909572	7,9177031
TNFAIP3*	8,65141543	8,175293865	8,25848163
TNFRSF9*	6,79612579	6,96481873	7,29194608
USP18	7,71084633	8,269375683	8,51728942

	TNFα	IL-6	EPO
Gen	Coef. gT - gC	Coef. gI - gC	Coef. gE - gC
A2M	-7,0347286	-5,62873672	-7,0347286
ACAN	-6,11893165	-4,95865176	-4,63631129
ADH1B	-6,05541542	-6,05541542	-6,05541542
AQP1	-4,64920067	-	-6,03128588
ASPN	-4,21582679	-6,0106646	-4,74434383
COL14A1	-5,85799835	-5,62919176	-
COL15A1	-8,91451041	-9,13092901	-8,89234526
COMP	-7,38240303	-7,21265969	-7,52408368
CRLF1	-7,23847062	-7,09243831	-5,16306791
CSGALNACT2	-	-	-6,51622719
HES1	-6,0945094	-5,37288083	-3,22673595
INMT	-4,5509779	-6,33212939	-4,40935801
NGFR	-5,24849366	-6,53191526	-6,54173546
PI16	-6,26972226	-9,13023876	-5,74697507
PODN	-	-6,12178977	-6,10515865
PPL	-5,52126195	-4,42191076	-6,23091437
STEAP4	-5,80843727	-5,88744597	-6,45907753
SVEP1	-8,86580243	-9,90356359	-10,3696685
ZNF512B	-6,17151297	-8,13993987	-

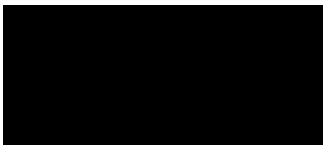
Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 05.09.2022



Denise Stephanie Jahn